

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

UDC: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学 学位论文

木质纤维素依赖型乳酸片球菌中外源功  
能基因的表达以及基因敲除

涂毅

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: \_\_\_\_\_ 论文答辩日期: \_\_\_\_\_

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席:

评 阅 人:

## 作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

2013 年 月 日

## 木质纤维素依赖型乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 中外源功能基因的表达以及基因敲除

### 摘要

乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 是一株耐高温和耐木质纤维素降解抑制物的乳酸高产菌株。本文从两个角度对 *P. acidilactici* DQ2 进行了改造,使其能够更为适合于木质纤维素生物炼制加工过程。首先,在 *P. acidilactici* DQ2 中建立了外源蛋白表达系统。对常用的乳酸菌表达载体 pMG36e 进行改造,将其启动子  $P_{32}$  更换为来源于 *P. acidilactici* DQ2 的 L-乳酸脱氢酶基因的启动子  $P_{ldhL}$ 。并通过新载体 pTY36e 成功表达了两种不同的外源基因:来源于维多利亚多管发光水母(*Aequorea victoria*)的绿色荧光蛋白基因 *gfp* 和来源于多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa* 1.794)的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglA*,其中所表达的胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力为 4.48 U/(g dry cells)。此系统的成功构建为后续对该菌的基因工程改造奠定了基础。其次,对 *P. acidilactici* DQ2 染色体上的 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 进行敲除以生产光学纯的 L-乳酸。将热敏性敲除质粒 pSET4S 上的壮观霉素抗性基因更换成红霉素抗性,并通过新质粒 pSET4E 构建敲除载体进行 *ldhD* 的敲除。结果显示,敲除菌株  $\Delta ldhD$  112 所产 L-乳酸的光学纯度达到 99.88%,并且在其胞内几乎检测不到 D-乳酸脱氢酶酶活。由于 D-乳酸为此 *P. acidilactici* DQ2 菌株细胞壁肽聚糖的组成成分,对 D-乳酸的消除使突变株对万古霉素的抗性急剧的下降。 $\Delta ldhD$  112 的构建使其所产乳酸具有更加广泛的应用价值,使该菌株具有更大的工业化生产潜力。上述工作对于 *P. acidilactici* DQ2 在生物炼制中的实际应用以及进一步的发酵性能拓展具有中重要的意义。

**关键词:** ~~*Pediococcus acidilactici* DQ2~~ 乳酸片球菌; 木质纤维素生物炼制; 乳酸; 表达系统; 基因敲除

带格式的: 字体: 宋体, 非倾斜

带格式的: 字体: 宋体

带格式的: 字体: 宋体, 非倾斜

## Expression of functional genes in lignocellulose-dependent *Pediococcus acidilactici* DQ2 and knockout of ~~the D-lactic dehydrogenase~~target gene

### 【做相应修改】

#### Abstract

*Pediococcus acidilactici* DQ2, isolated by our lab, is thermotolerance and high resistant to the inhibitors derived from lignocellulose and can produce high titer of lactic acid. In order to make this strain more adaptable to the lignocellulose biorefinery engineering process, we modified *P. acidilactici* DQ2 from two aspects. HereFirst, we have establish~~constructed~~ heterologous protein expression system genetic manipulation tools in *P. acidilactici* DQ2 for the first time ~~and expressed two different heterologous genes successfully, green fluorescent protein gene (*gfp*) from *Aequorea victoria* and  $\beta$ -glucosidase gene (*bglA*) from *Bacillus polymyxa* 1.794. First, ~~T~~ the lactic acid bacterial expression vector pMG36e was modified by replacing the promoter P<sub>32</sub> with P<sub>ldhL</sub> derived from *P. acidilactici* DQ2, Then expressed two different heterologous genes successfully with the new plasmid pTY36e, green fluorescent protein gene (*gfp*) from *Aequorea victoria* and  $\beta$ -glucosidase gene (*bglA*) from *Bacillus polymyxa* 1.794, the results showed that the  $\beta$ -glucosidase enzyme activity of the recombinant bacteria was 4.48U/(g dry cells) detected in the intracellular fraction. The successful construction of this system layed the foundation for the subsequent genetically engineering of *P. acidilactici* DQ2. Second, ~~and the results indicated that the promoter P<sub>ldhL</sub> can regulate the expression of heterologous gene *gfp* successfully. Then the  $\beta$ -glucosidase gene *bglA* was expressed by the modified vector pTY36e, and the results showed that the  $\beta$ -glucosidase enzyme activity of the recombinant bacteria was 4.48U/(g dry cells) detected in the intracellular fraction.~~~~

~~In order to produce optical pure L-lactic acid,~~ we try to knockout the D-lactic dehydrogenase coding gene *ldhD* of *P. acidilactici* DQ2 to produce optical pure L-lactic acid. First, ~~M~~we modified the thermosensitive knockout plasmid pSET4S by replaced the spectinomycin marker with erythromycin and then use the new plasmid pSET4E to construct knockout vector to delete *ldhD*. Results show that we succeeded in eliminating the production of D-lactic acid, the optical purity of L-lactic acid produced by the mutant strain  $\Delta$ *ldhD* 112 was 99.88%. Moreover, we can not detect D-lactic dehydrogenase activity in  $\Delta$ *ldhD* 112. As D-lactate was the terminal of cell wall peptidoglycan of *P. acidilactici* DQ2, remove the production of D-lactate reduce it's resistant to vancomycin

带格式的：缩进：左 1.13 字符

带格式的：字体：小四

带格式的：两端对齐，缩进：左 1.13 字符，行距：单倍行距

significantly. The successful construction of  $\Delta ldhD$  112 makes the lactic acid more usefull and makes this strain more potential as industrail production strain. The above work is important to the pratical application of this strain in biorefinery and the further development of it's fermentation ability.

**Keywords:** *Pediococcus acidilactici* DQ2; Lignocellulose biorefinery; Lactic acid;  
Expression system; Gene kKknockout; Lactic dehydrogenase; Lactic acid

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 六号

带格式的: 缩进: 左 0.85 字符

## 目录

第 1 章 文献综述 .....	1
1.1 乳酸概述 .....	1
1.1.1 乳酸的结构及性质 .....	1
1.2 木质纤维素 .....	1
1.2.1 木质纤维素的预处理以及脱毒 .....	2
1.2.2 木质纤维素糖化与发酵 .....	3
1.2.3 利用木质纤维素生产乳酸 .....	3
1.3 乳酸菌概述 .....	4
1.3.1 乳酸菌分类 .....	4
1.3.2 乳酸菌的生理功能 .....	5
1.3.3 乳酸菌的应用-细菌素的生产 .....	6
1.3.4 乳酸菌的应用-作为外源蛋白的表达宿主 .....	76
1.3.5 乳酸菌的应用-活细胞疫苗 .....	7
1.4 乳酸菌表达系统 .....	7
1.4.1 组成型表达系统 .....	7
1.4.2 诱导型表达系统 .....	8
1.5 乳酸菌基因敲出系统 .....	9
1.5.1 基于自杀质粒的敲除系统 .....	109
1.5.2 热敏型敲除系统 .....	10
第 2 章 乳酸片球菌 <i>P. acidilactici</i> DQ2 中外源功能基因的表达 .....	12
2.1 前言 .....	12
2.2 实验材料 .....	13
2.2.1 菌株与载体 .....	13
2.2.2 主要试剂 .....	13
2.2.3 实验仪器 .....	14
2.2.4 培养基, 主要溶液的配制 .....	15
2.3 实验方法 .....	17
2.3.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 <i>bglA</i> 以及 L-乳酸脱氢酶基因启动子 $P_{ldhL}$ 的克隆 .....	17
2.3.2 重组表达载体 pMG36e- <i>bglA</i> 的构建、pMG36e 的改造以及 pTY36e- <i>bglA</i> 的构建 .....	19
2.3.3 重组菌荧光检测 .....	20
2.3.4 重组乳酸片球菌 PT3 SDS-PAGE 电泳及分析 .....	21
2.3.5 重组菌 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力测定 .....	21
2.4 结果 .....	22
2.4.1 表达载体 pTY36e 的构建与荧光蛋白基因 <i>gfp</i> 的表达 .....	22
2.4.2 表达载体 pTY36e- <i>bglA</i> 的构建以及 $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达 .....	25
2.5 本章小结 .....	26
第 3 章 <i>P. acidilactici</i> DQ2 D-乳酸脱氢酶基因 <i>ldhD</i> 的敲除 .....	27

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式的: 字体: Times New Roman

3.1 前言 .....	27
3.2 实验材料 .....	<a href="#">2827</a>
3.2.1 菌株与载体 .....	<a href="#">2827</a>
3.2.2 实验试剂、仪器 .....	28
3.2.3 培养基, 主要溶液的配制 .....	28
3.3 实验方法 .....	<a href="#">2928</a>
3.3.1 热敏性载体 pSET4S 的改造 .....	<a href="#">2928</a>
3.3.2 敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD 的构建 .....	<a href="#">3029</a>
3.3.3 D-乳酸脱氢酶基因敲除单交换菌株的筛选 .....	<a href="#">3130</a>
3.3.4 D-乳酸脱氢酶基因敲除双交换菌株的筛选 .....	<a href="#">3332</a>
3.3.5 乳酸构型的测定 .....	<a href="#">3332</a>
3.3.6 乳酸脱氢酶酶活的测定 .....	<a href="#">3433</a>
3.3.7 蛋白浓度的测定 .....	<a href="#">3534</a>
3.3.8 <i>P. acidilactici</i> DQ2 以及 <i>P. acidilactici</i> $\Delta$ ldhD 112 对万古霉素抗性实验 .....	<a href="#">3635</a>
3.3.9 <i>P. acidilactici</i> DQ2 以及 <i>P. acidilactici</i> $\Delta$ ldhD 112 的生长状况实验 .....	<a href="#">3735</a>
3.3.10 野生菌株及突变株对抑制物耐受实验 .....	<a href="#">3736</a>
3.4 结果 .....	<a href="#">3736</a>
3.4.1 敲除载体 pSET4S 的改造 .....	<a href="#">3736</a>
3.4.2 敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD 的构建 .....	<a href="#">3837</a>
3.4.3 D-乳酸脱氢酶基因敲除单交换菌株的筛选 .....	<a href="#">4038</a>
3.4.4 D-乳酸脱氢酶基因敲除双交换菌株的筛选 .....	<a href="#">4139</a>
3.4.5 D-乳酸脱氢酶基因敲除菌株乳酸构型的测定 .....	<a href="#">4344</a>
3.4.6 乳酸脱氢酶活力的测定 .....	<a href="#">4342</a>
3.4.7 野生菌株以及敲除菌株对万古霉素抗性实验 .....	<a href="#">4543</a>
3.4.8 <i>P. acidilactici</i> $\Delta$ ldhD 112 生长状况研究 .....	<a href="#">4644</a>
3.4.9 突变株对抑制物耐受性研究 .....	<a href="#">4745</a>
3.5 本章小结 .....	<a href="#">5149</a>
第 4 章 结论与展望 .....	<a href="#">5250</a>
参考文献 .....	<a href="#">5354</a>
致谢 .....	<a href="#">6057</a>



## 第 1 章 文献综述

### 1.1 乳酸概述

乳酸又名 2-羟基丙酸，是一种极其重要的化学品。在医药、食品、纺织、制革、化妆品和环保等领域有着广泛的用途。乳酸的生产方法主要有生物发酵和化学合成两种方式，由于化学合成的乳酸一般为 D,L-混合型的，而乳酸单体的光学纯度是其实际应用中一个非常重要的参数。所以通过生物发酵来生产一种构型的乳酸更加受到人们的青睐，事实上，全球 90% 以上的乳酸是通过微生物发酵生产的<sup>[1]</sup>。

#### 1.1.1 乳酸的结构及性质

乳酸分子式为  $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ，又名  $\alpha$ -羟基丙酸、2-羟基丙酸，分子量为 90.08。由于在其碳链上有一个非对称的碳原子，所以乳酸分子具有旋光性。乳酸存在着两种同分异构体：D(-)-乳酸和 L(+)-乳酸，其结构式如下图 1.1。由于 D(-)-乳酸是人体所不能吸收的，所以食品行业会严格控制其含量，特别是对于婴幼儿食品。乳酸菌生产乳酸是由乳酸脱氢酶基因将丙酮酸转化为乳酸，而两种构型的比例则由 L-乳酸脱氢酶以及 D-乳酸脱氢酶两种基因的表达水平决定<sup>[2]</sup>。

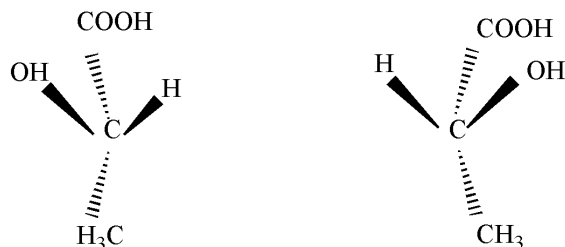


图1.1 乳酸结构式

Fig. 1.1 Configuration of Lactic acid

带格式的: 字体: Times New Roman

乳酸分子含有一个羧基以及一个羟基，可以进行氧化、还原、缩合等反应，而脱水聚合生成聚乳酸是目前应用最为广泛的反应之一。聚乳酸是一种生物可降解高分子化合物，由于其环境友好型特点使之成为替代石油基化合物生产塑料的良好材料，并且在其他领域也具有重要的应用价值，如环保、医药等。

### 1.2 木质纤维素

伴随着经济的高速发展，在过去的 20 年间中国对能源的消耗翻了三番，截止到 2006 年，达到了 24 亿吨标准煤<sup>[3]</sup>。全球能源消耗也在大步的增加，并且有人预测，到 2050

年全球的石油产量将会从 250 亿桶减少到 50 亿桶<sup>[4]</sup>。而世界经济的发展离不开能源，并且化石燃料的燃烧会造成严重的环境污染，同时二氧化碳的排放会致使全球气候变暖，所有的这些都促使各国积极地寻找可替代的再生能源。在短期内，生物质能是唯一合适的以及可再生的能源资源。木质纤维素是全球储量最大的生物质能，截止到 2008 年，全球的产量大约在  $1 \times 10^{10}$  百万吨<sup>[5]</sup>。因此，如果能够将木质纤维素转化为可利用的能源物质，如乙醇、丁醇等将会带来巨大的经济利益，还能够解决能源危机问题。事实上，近年来各国都投入极大的人力、物力以及财力在木质纤维素的生物转化上，以期能够在生物质能方面取得突破，占得先机。

木质纤维素为植物细胞壁的主要构成部分，主要由纤维素、半纤维素、木质素三部分组成，其在细胞壁中的构型如下图 1.2 所示。且三部分的比例在不同植物里是不一样

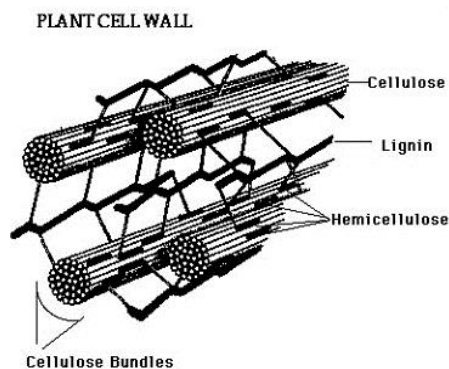


图1.2 木质纤维素的结构

Fig. 1.2 The structure of lignocellulose

的，总的生物量也是不一样的。例如软木木材和硬木木材差别就很大，前者中纤维素和半纤维素的总含量比后者中要低，分别是 70.3% 和 78.8%<sup>[6]</sup>。

由于木质纤维素里的三部分是相互缠绕在一起的，组成一种比较坚固的结构，对外界的降解具有很强的抵抗性。因此要用其来生产目的产品就必须先对此种材料进行预处理，以破坏这种聚合结构，从而提高下一步的酶解以及发酵效率。预处理方法从大的方向上可以分为微生物预处理、物理预处理、化学预处理以及物理化学预处理等，目前最高效以及最有运用前景的主要是化学以及热化学预处理方法<sup>[5, 7]</sup>。

### 1.2.1 木质纤维素的预处理以及脱毒

木质纤维素原料经过生物转化来生产纤维基化学品需要经过预处理、酶水解以及发酵等相关步骤<sup>[8]</sup>。在预处理过程中会产生一些抑制物，如糠醛，5-羟甲基糠醛，乙酸等物质<sup>[9]</sup>，这些抑制物会对后续的微生物生长发酵产生严重的影响。因此在发酵之前需要对预处理过的物料进行脱毒处理，以使发酵条件能够满足要求。通常最为简单的预处理方法是对物料进行水洗，从而降低抑制物的浓度<sup>[10]</sup>。但是这种方法会产生大量的废水，

带格式的：字体：(默认) Times New Roman

带格式的：字体：(默认) Times New Roman

带格式的：字体：(默认) Times New Roman

带格式的：字体：Times New Roman

对环境造成污染。最近也有学者发现某些微生物能够转化这些抑制物成分，如 Zhang 等<sup>[11]</sup>分离得到了一株高效的脱毒微生物。在预处理完了以后，直接将此种真菌接种到固体物料里面，它将会利用抑制物作为生长所需的碳源，可以达到非常好的脱毒效果。

在寻找好的脱毒方法的同时，也需要筛选能够对木质纤维素体系具有良好适应性的微生物，能够耐受高浓度的抑制物，而不至于在此体系里面不能进行正常的发酵。这样可以减轻脱毒的压力，如果发酵菌种具有足够的耐受性的话，甚至可以直接进行发酵，省去脱毒步骤，这样可以大大的降低生物炼制行业的成本。

### 1.2.2 木质纤维素糖化与发酵

因为大部分微生物只能利用单糖进行发酵，所以必须对预处理过的物料进行水解，利用稀酸或者纤维素酶将聚糖水解为单糖。由于酸水解的条件较为苛刻，并且效率较低，所以现在逐渐被酶水解所替代<sup>[12]</sup>。

而发酵模式可以分为两种，即同步糖化发酵以及分步糖化发酵<sup>[13]</sup>。分步糖化发酵就是将糖化与发酵分开，在糖化完了以后，再接入微生物。而同步糖化发酵是将糖化与发酵在同一个反应器里面同时进行，由于这种发酵模式边糖化边发酵，所以可以降低产物对纤维素酶的反馈抑制，并且简化了工艺，降低了设备投资，所以在生物炼制行业中用得较多。

### 1.2.3 利用木质纤维素生产乳酸

由于化石燃料的日益枯竭以及持续恶化的生态环境，使得人们转向寻找更为清洁、可持续的能源。在此背景下，生物炼制行业获得了极大的关注，全世界有大量的研究者在此领域进行着各种各样的研究，以期能够获得突破。以木质纤维素作为原料生产乳酸是一个比较热门的方面，也有大量的文献报道。

Wee YJ 等<sup>[14]</sup>以木材水解液作为原料，用 *E.faecalis* RKY1 进行分批发酵，结果获得了 93 g/L 的乳酸，并且基于相对所消耗的糖糖耗的乳酸得率高达 0.93。

Yun JS 等<sup>[15]</sup>以大米以及小麦糠麸作为原料，在添加  $\alpha$ -淀粉酶以及淀粉转葡萄糖苷酶糖化后，用 *Lactobacillus sp.* RKY2 进行批式发酵，同时添加大米粉，结果能够获得 129 g/L 的乳酸。如果利用木质纤维素水解液作为原料进行细胞循环发酵，能够获得 27 g/L 的乳酸，得率为 0.9。

Cui FJ 等<sup>[16]</sup>以碱预处理过的玉米秸秆作为原料，用 *Lactobacillus rhamnosus* 以及 *Lactobacillus brevis* 进行混合发酵，从而综合利用葡萄糖以及木糖，并配合同步糖化发酵，结果能够获得 0.7 g 乳酸/糖的得率，与用纯糖(葡萄糖/木糖为 3:1)发酵的得率 0.73 相当。

Zhu YM 等<sup>[17]</sup>利用 *Lb. pentosus* ATCC 8041 发酵氨水预处理过的玉米秸秆生产乳酸，同步糖化发酵条件下基于所消耗的糖(葡萄糖，木糖以及阿拉伯糖)的乳酸得率达到 92%，并且最高能够获得 75 g/L 的乳酸。

Okano K 等<sup>[18]</sup>对 *Lactobacillus plantarum* 进行基因工程改造，将 L-乳酸脱氢酶基因进行敲除，从而达到产光学纯的 D-乳酸的目的。同时，通过质粒表达系统表达来源于

*Clostridium thermocellum* 的纤维素内切酶基因 *CelA*。在添加一定量的  $\beta$ -葡萄糖苷酶条件下，重组菌能够直接利用  $\beta$ -葡聚糖进行乳酸发酵，生产 1.47 g/L 的 D-乳酸，光学纯度达到 99.7%。

### 1.3 乳酸菌概述

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类能够发酵碳水化合物并主要产生乳酸的微生物，这类微生物在发酵或者制作食品领域已经应用了最少 4000 年，是被公认为安全级的微生物(generally recognized as safe, GRAS)。乳酸菌在自然界中种类很多，分布广泛，有些种类生活在动物的肠、胃、口腔之中，皮肤表面以及乳、乳制品、肉类制品中，有的生存在蔬菜、水果、谷物及植物制品上<sup>[19]</sup>。大部分乳酸菌属于革兰氏阳性菌，兼性厌氧，不能形成芽孢，过氧化酶阴性，不能形成色素，不能合成含铁的叶琳化合物。但是，在一些特定情况下乳酸菌并不能展现以上所有的性质，~~因此~~，其最大的特性~~是~~革兰氏阳性以及不能够合成卟啉类化合物。不能够合成卟啉类化合物使得它们缺乏过氧化氢酶以及细胞色素，因此乳酸菌缺乏电子传递链，必须依赖发酵来产生能量。由于它们在产能时不利用氧气，因此乳酸菌在厌氧条件下生长，但是在有氧时也能够生长。并且由于较低的产能效率，乳酸菌相比那些能够进行呼吸作用的微生物来说长得非常慢，菌落也比较小<sup>[20]</sup>。

乳酸菌对营养要求较为复杂，因为一般乳酸菌没有蛋白酶，不能分解利用蛋白质。合成维生素、氨基酸、核酸的能力极低，因而在生长的环境中需要适量地加入维生素、其他类生长因子等，同时大部分乳酸菌也不能利用复杂的碳水化合物<sup>[21]</sup>。

它们的生长温度范围从 5 °C 到 45 °C，并且具有强抗酸能力，大部分能在在 pH4.4 条件下生长，其最适 pH 范围在 5.5-6.5<sup>[21]</sup>。~~如在一~~含糖丰富的食物制作中，虽然其他很多的菌类也能生长，但因乳酸菌不断地产生乳酸使得环境~~酸化从而能~~杀死多种不耐酸的细菌。

#### 1.3.1 乳酸菌分类

乳酸菌是非常大的一类微生物，至少包括 20 个属<sup>[20]</sup>，主要有：乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明珠串球菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)等。其中乳杆菌属是最大的一类，包含将近 80 个种。这类微生物主要与植物(大白菜，玉米，饲料等)、肉类、以及乳制品联系在一起，并且其最大的用途是用于乳制品生产的发酵剂，比如酸奶，奶油，奶酪等。

乳酸菌的主要代谢产物为乳酸(Lactic acid)，而乳酸由于具有一个非对称的碳原子，所以乳酸分子具有旋光性。大部分的乳酸菌所生产的乳酸为 D,L-混合型乳酸，只有少数野生型乳酸菌能够只产一种构型的乳酸。

而乳酸菌的乳酸发酵可以分为两种方式，同型乳酸发酵以及异型乳酸发酵<sup>[22, 23]</sup>。同型乳酸发酵菌能够将糖底物大部分转化为乳酸(85%以上)，主要走 EMP 代谢路径。这类

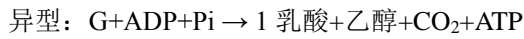
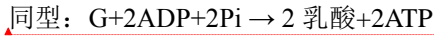
带格式的：字体：Times New Roman

带格式的：字体：Times New Roman

带格式的：字体：(默认) Times New Roman

带格式的：字体：(默认) Times New Roman

微生物包括乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)、乳酪链球菌(*Streptococcus cremoris*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus easei*)等。而异型乳酸发酵主要走 PK 以及 HK 途径,所有产物里面仅有低于乳酸的含量低于 50%,还有大量的乙醇、乙酸、甲酸以及 CO<sub>2</sub> 产生,如一



些明串珠菌(*Leuconostoc*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)等。

带格式的: 字体: 非加粗  
带格式的: 缩进: 首行缩进: 4.43 字符

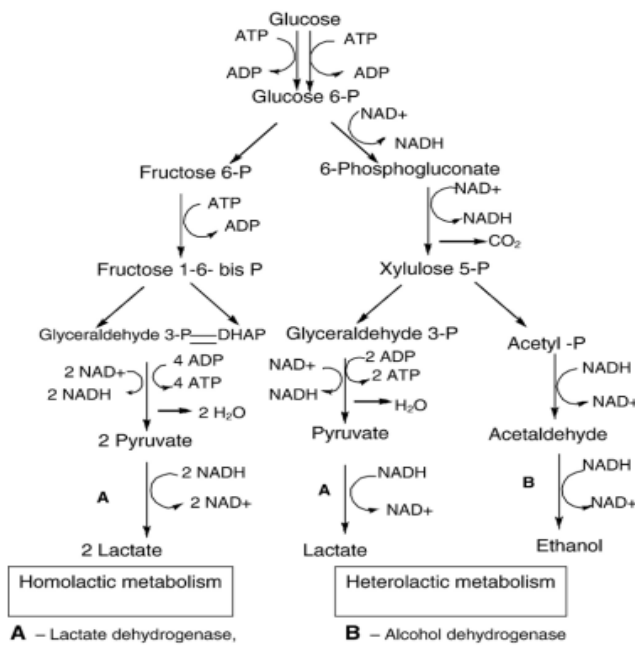


图1.3 乳酸菌乳酸发酵模式<sup>[22]</sup>

Fig. 1.3 The fermentation patterns of lactic acid bacterial

带格式的: 字体: (默认) Times New Roman  
带格式的: 字体: (默认) Times New Roman  
带格式的: 字体: (默认) Times New Roman  
带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 上标

### 1.3.2 乳酸菌的生理功能

乳酸菌最早被应用在食品行业,并且现在也是在此方面应用得最为广泛。作为一些食品的发酵剂,比如酸奶、奶酪以及泡菜等,它们能够将食物里面的碳水化合物转化为乳酸,从而降低整个环境的 pH 值进而抑制一些腐败微生物的生长,以起到保藏食物的作用。并且,在乳酸菌的生长发酵过程中还会产生一些提高食品风味的物质,比如乙偶姻等<sup>[24, 25]</sup>。伴随着对这类微生物的研究,人们逐渐发现乳酸菌还有很多其他方面的好处以及用途,如很多属的乳酸菌是益生菌,能够产生细菌素,能够用来表达外源蛋白以作为活细胞疫苗等。

乳酸菌可以粘附在肠粘膜上,从而形成一个大的生物屏障抵御大肠杆菌、伤寒杆菌等致病微生物的侵袭,并且乳酸菌可以产生生物素,抑制致病菌以及腐败微生物的生长繁殖。LAB 还具有其他的一些生理功能,比如说能够降低胆固醇、具有抗变异原性、

改善肝脏功能、增强免疫功能以及可以延缓衰老等。LAB 能够增强免疫功能是因为一方面乳酸杆菌以及双歧杆菌一方面能够激活人体巨噬细胞的吞噬作用,另一方面它们定植在人肠道内,相当于一道自然免疫系统。而延缓衰老是因为有些研究者发现 LAB 能够产生超氧化物歧化酶(SOD),而 SOD 能够清除体内代谢过程中产生的过量的超氧阴离子自由基<sup>[26, 27]</sup>。

### 1.3.3 乳酸菌的应用-细菌素的生产

细菌素是某些细菌在代谢过程中由核糖体合成的有生物活性的蛋白质,能够杀死或者抑制其他微生物的生长。它们是一类纯天然的生物抗微生物因子,相比抗生素具有非常大的优势,例如不会引起病原微生物的抗性、来源于乳酸菌的细菌素可以用于食品行业中<sup>[28]</sup>。由于食品安全越来越受到国际社会的关注,因此来源于乳酸菌的能够抗食品病原菌的没有毒性以及不会产生其他副作用的细菌素受到极大的关注。

细菌素最早在革兰氏阴性菌中定性研究,而来自大肠杆菌的大肠杆菌素研究得最早。到目前为止,研究最多最热的则是来源于乳酸菌的细菌素。因为乳酸菌是一类普遍认为安全的菌株(GRAS),它们产生的细菌素也是安全的,可以作为天然的防腐剂直接应用于食品行业。能够产生细菌素的乳酸菌非常多,有 *Streptococcus sp*、*Lactob. delbrueckii*、*Lac. lactis*、*Lactob. plantarum*、*Leuconostoc. carnosum*、*Lactob. bavaricus*、*Enterococcus mundtii*、*P. acidilactici*、*P. pentosaceus* 等。尽管如此,但是只有来源于 *Lac. lactis* 的 nisin 是唯一一种广泛用于食品保藏的细菌素。很多其他的细菌素虽然研究得也比较多,在生化以及基因水平上的了解也比较清楚,但是这些化合物的其他方面研究得还是不够透彻<sup>[29]</sup>。

大致上可以将细菌素分为三类,具体见下表 1.1<sup>[29]</sup>。

表 1.1 细菌素分类

Table 1.1 Classification of bacteriocins

分类	特性	实例
I	Lantibiotics, <5KDa, 含有羊毛硫氨酸以及 β-甲基羊毛硫氨酸	Nisin
II	分子量小, 热稳定, 在 N-末端具有 YGNGV-C 保守序列	Pediocin PA-1, sakacins A
III	分子量大, 热敏感	lactacins A 和 B

乳酸片球菌是一大类重要的产细菌素微生物,与 nisin 相比片球菌素的最大优点就是对李斯特氏菌的抑制效果明显,对其他的革兰氏阴性菌也有比较好的抑菌活性,显示出较广泛的抑菌谱。而且活性受 pH 影响小,容易溶解,具有作为食品保藏剂的巨大潜力,因此片球菌素的研究成为了人们关注的焦点<sup>[30]</sup>。

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式表格

带格式表格

### 1.3.4 乳酸菌的应用-作为外源蛋白的表达宿主

以乳酸菌作为细胞工厂具有很多的优势：乳酸菌具有很长的安全使用的历史，并且在培养基中生长比较快；乳酸菌在世界范围内被用于食品发酵行业的发酵剂，这就意味着经过代谢工程改造过的乳酸菌不仅可以应用在生物反应器尺度上，并且可以在发酵食品的同时在位发酵生产调料或者保健产品等；基因组小并且全基因组信息丰富，缺乏基因多样性；代谢路径简单，将大部分糖底物转化为乳酸；胞外分泌蛋白少，有利于后续蛋白纯化<sup>[31]</sup>。

### 1.3.5 乳酸菌的应用-活细胞疫苗

由于一些乳酸菌是食品级的比如乳酸乳球菌，它没有侵染性，不会致病，并且具有很长的发酵生产乳制品的历史，因此非常的安全，并且研究也表明肠胃中的乳酸菌对人体健康在某种程度上是有利的。乳酸乳球菌能够在体内进行增值，当以活菌喂养到动物后，它们将会很快的穿过胃肠道而不会进行定植。经过基因工程改造后的菌株能够很好地将抗原传递到粘膜免疫系统从而诱导免疫反应的发生<sup>[32]</sup>。乳酸乳球菌已经成功地表达了多种细菌以及病毒抗原，比如 Hirt H 等人<sup>[33]</sup>在乳酸乳球菌中表达了来源于粪肠球菌的聚合物质蛋白，并且蛋白分布在细胞表面。这种蛋白能够增加细胞表面的疏水性并且提高对纤维蛋白的吸附能力。Gilbert C 等人<sup>[34]</sup>成功地在 *L. lactis* 中表达了来源于病原菌 *Streptococcus pneumoniae* 的抗原-荚膜多糖，从而构建活的疫苗载体，以刺激人体的粘膜免疫系统。

## 1.4 乳酸菌表达系统

近几十年，全球范围内对乳酸菌的遗传研究投入了很多的努力，使乳酸菌研究的基因技术取得了很大的进展，比如转化技术、表达载体以及扩增系统等。另外，一些复杂的、持续性的、安全的选择系统也被开发出来并已经成功地应用于食品领域。同时，现在已经有大量的乳酸菌全基因组信息可以进行查询，因此方便了其作为宿主进行外源基因的表达。最为重要的是，要使乳酸菌成为外源蛋白的表达工厂并且能够获得较高的表达量，就必须开发出好的乳酸菌表达系统以及外源蛋白分泌系统<sup>[35]</sup>。

### 1.4.1 组成型表达系统

组成型表达系统是能够随着细胞繁殖而进行持续蛋白表达的表达系统，此系统具有较高的表达效率。但是同时，由于其持续的蛋白表达会对宿主菌的生长代谢产生一定的干扰。其中 pMG36e 是乳酸菌中用得最多的组成型表达质粒质粒，该质粒由荷兰学者于 1988 年构建<sup>[36]</sup>。此表达载体上带有来源于乳酸乳球菌隐蔽性质粒 pWV01 的复制子，还包括红霉素抗性基因，组成型启动子 P<sub>32</sub> 以及终止子等元件。自构建以来，~~该质粒就得到了很广的应用~~该质粒就得到了广泛的应用，如用于细菌素作用机制的研究，乳酸菌口服疫苗的开发等。

-van de Guchte M 等<sup>[36]</sup>构建此质粒后就用它进行了外源蛋白的表达，将溶菌酶融合蛋白克隆到该载体上。~~将重组菌进行破碎，然后进行蛋白质电泳验证~~，发现在 17 KDa

的位置有一条目的条带, 大小与理论值相符, 说明该载体能够成功地表达外源蛋白。

Chikindas ML 等<sup>[37]</sup>运用 pMG36e 表达来源于 *Pediococcus acidilactici* PAC1.0d 的片球菌素 Pediocin PA-1, 表达宿主为乳酸乳球菌。并且发现在表达该蛋白时, 如果启动子为编码该蛋白的操纵子上自带的启动子时, 该蛋白不能够被表达, 只能采用乳酸菌来源的启动子。

Kim SJ 等<sup>[38]</sup>利用 pMG36e 在 *Lactococcus lactis* MG1363 中表达来源于 *Helicobacter pylori* 的外膜蛋白作为抗原, 以达到构建活细胞疫苗的目的。构建表达该蛋白的重组菌后, Western blot 分析发现蛋白表达成功, 并且在对数期获得最高的表达量。

Raha AR 等<sup>[39]</sup>在 *Lactococcus lactis* 中表达来源于 *Bacillus coagulans* ST-6 的耐热性木聚糖酶基因, 以研究该基因是否能够成为 *Lactococcus* 中基因克隆以及表达的报告基因。将整个操纵子基因插入到 pMG36e 红霉素抗性基因以及复制子中间位置(非多克隆位点)。结果通过筛选平板发现该蛋白成功地得到了表达, 并且实验中发现带有重组质粒的大肠杆菌培养温度高于 32 °C 时, 重组质粒将会出现丢失的情况。

孙芝兰等<sup>[40]</sup>通过 pMG36e 以及 pSEC 载体在乳酸乳球菌中表达来源于 *Paenibacillus* sp. K1 的乳糖酶基因 *bga*, 以提高乳糖不耐症。通过 SDS-PAGE 证明, 该蛋白在 *L. lactis* MG1614 成功地实现了表达。

Liang XB 等<sup>[41]</sup>通过 pMG36e 在 *L. lactis* MG1363 中表达来源于枯草芽孢杆菌的纳豆激酶, 但是构建好工程菌后, Western blot 以及纤溶分析均检测不到相应蛋白。将 P<sub>32</sub> 启动子更换成诱导型的启动子 P<sub>nisZ</sub> 并在 *L. lactis* NZ9000 中进行诱导表达, 获得了成功。因此可以看出, P<sub>32</sub> 启动子在表达某些外源基因时其活性是不够强的。

Juan B 等<sup>[42]</sup>通过将肠道菌素 EntP 以及 HirJM79 编码基因与信号肽序列 SP<sub>usp45</sub> 进行融合并用载体 pMG36C 以及 pNZ8048(诱导型)进行分泌表达。结果发现, 构建的工程菌株所表达的蛋白量是两种细菌素野生生产菌株的 1.5 到 3.7 倍。但是, 同时发现重组菌所表达的 HirJM79 活力仅仅是野生菌株的 40% 到 89%, 而工程菌株所表达的 EntP 分别是野生菌的 1.1 到 6.2 倍。

Asuman KS 等<sup>[43]</sup>将 *L. lactis* MG1363 的二乙酰还原酶基因 *dar* 克隆到 pMG36e 上并在自身中进行过表达, 以期改变该菌株的代谢流, 产生更多的风味物质如乙偶姻等, 从而达到改善乳制品口味的目的。通过 HPLC 检测发现, 重组菌从同型乳酸发酵转变成了混合酸发酵, 并且重组菌所产乙偶姻的量比起始菌株高出很多。

另外, 还有很多其他的乳酸菌表达载体, 如食品级的乳球菌表达载体 pFMN30、乳杆菌表达载体 pLP82H 以及 pLEM415、乳杆菌乳球菌表达载体 pSIP400 等。这些表达质粒都是通过实际验证, 能够进行外源基因的表达, 并且十分的高效。Shareck J 等<sup>[44]</sup>综述了从乳酸菌中分离得到的一些隐蔽性质粒并从它们出发构建的克隆载体, 其中包括乳酸乳球菌、乳杆菌、链球菌、明珠串球菌、片球菌以及双歧杆菌等。

#### 1.4.2 诱导型表达系统

诱导型表达系统是指需要加入诱导物才能够启动目标蛋白表达的系统。当菌体生长

到一定阶段后再加入诱导物开始蛋白的表达,这样能够避免组成型表达系统在菌体生长还没有进入很好的阶段就进行表达给宿主生长带来的压力。因此,从这个角度来看诱导型表达系统能够获得更高的表达量,并且在实际应用中有研究证明确实诱导表达比持续表达更加的高效。当然,诱导表达的水平也会受到诱导时间以及诱导剂的添加量的影响,因此在进行特定蛋白的表达时需要对这些因素进行优化<sup>[45]</sup>。

其中乳酸菌中应用最为广泛的诱导表达系统为 *nisin*-控制表达系统(NICE),该系统最早由 Kuipers OP 等于 1995 年建立。他们发表了一篇关于乳球菌细菌素 *nisin* 的自动诱导表达系统,并且同时用此机制外源诱导表达了来源于大肠杆菌的葡萄糖醛酸酶,从而揭开了至今最为成功、应用最为广泛的革兰氏阳性菌诱导表达系统-NICE 的序幕<sup>[46]</sup>。与此表达系统相对应的表达宿主主要是 *L. lactis* NZ9000 等系列,在这些菌株的基因组上整合有该表达系统所必需的调控蛋白的编码序列 *nisRK*。而相对应的表达载体主要为 pNZ9573 系列,这些载体上具有诱导型表达启动子  $P_{nisA}$ 。

Shigemori S 等<sup>[47]</sup>通过 NICE 系统在 *Lactococcus lactis* 中进行了 GFP 以及  $\alpha_{S1}$ -酪蛋白的融合表达,以促进对特定牛奶过敏原的免疫性研究。经过优化,发现最适的 *nisin* 添加量为 50 ng/mL,最适的菌体诱导菌量为  $OD_{600}=0.4$ ,绿色荧光的最大检测强度在诱导后的 2-3 h。

Tseng WC 等<sup>[48]</sup>在 *Lactococcus lactis* 中表达了来源于 *Synechocystis sp* PCC6803 的藻青素合成酶 *cphA*,结果发现该蛋白的最适诱导表达时期为对数生长期,最适的诱导剂 *nisin* 添加量为 250 ng/mL,并且需要添加 20 mM 的精氨酸以及 10 mM 的天冬氨酸作为合成藻青素的原料,并且通过 SDS-PAGE 证明了目标蛋白的表达获得成功。

## 1.5 乳酸菌基因敲出系统

在研究基因组上某个未知基因所编码产物的功能以及对其预期的功能进行验证时,需要将该基因进行敲除,根据敲除结果来进行功能判断。同时,为了对某微生物进行遗传改造,如对其代谢流进行转移以消除某种副产物的生成以及加强某种目标产物的生产,也需要对基因组上基因进行敲除。由于通过质粒载体进行外源基因的表达存在着很多的问题,比如质粒载体存在不稳定的问题,在生长过程中发生丢失,需要添加抗生素以施加压力。如果能够将需要表达的外源基因整合到宿主的基因组上,就能很好的解决这些问题。前述问题都涉及到在宿主菌的基因组中敲除或者加入某个基因,而基因的敲除或者整合通常所用的基本原理为同源重组,即外源基因片段如果同宿主菌的基因组上某片段具有很高的同源度的话两者将会发生交换。

通常采用自杀质粒为载体构建敲除系统,将靶基因上游以及下游片段或者不完整的靶基因连接到自杀质粒上并转入宿主菌中,以敲除或者破坏靶基因。由于对大肠杆菌的研究非常多,所以其基因敲除系统也比较成熟,如 Red 重组系统就非常的高效<sup>[49]</sup>。而作为革兰氏阳性菌的乳酸菌的基因敲除系统则相对不是那么的完善,大部分的敲除还是

采用自杀质粒。而近年来出现了比较高效的热敏性敲除系统，以下进行逐一介绍。

### 1.5.1 基于自杀质粒的敲除系统

自杀质粒敲除系统是借助不能够在宿主中复制的质粒对宿主染色体上的靶基因进行突变。此系统必须具有以下几个要素：①自杀质粒在宿主中不能够复制；②必须具有一个在质粒整合到染色体上后可供选择的抗性标记；③必须带有同源基因片段。当敲除质粒被导入宿主菌后将会发生两次同源重组，从而对靶基因进行敲除。此系统具有很长的应用历史，但是其效率比较低，需要进行大量的筛选工作。特别是对那些转化效率比较低的革兰氏阳性菌来说，运用其进行基因敲除更加的困难。在乳酸菌中，一些学者通过此系统成功地~~地~~对目的基因进行了敲除。

Ferain T 等<sup>[50]</sup>通过不能在乳酸菌中复制的 pJDC9 质粒对 *Lactobacillus plantarum* 染色体上的乳酸脱氢酶基因 *ldh* 进行敲除。在此载体上带有 *ldhD* 基因 5'端的一段缺乏表达信号以及前 5 bp 的区域 D1，以及 *ldhD* 基因 3'端直至终止密码子的基因片段 D2，并且在同源片段 D1、D2 之间插入能够在宿主中起作用的氯霉素抗性标记。将此敲除质粒导入宿主菌后首先在红霉素以及氯霉素双抗平板上筛选单交换即第一次同源重组菌株，然后筛选红霉素敏感、氯霉素抗性的双交换即第二次同源重组菌株。通过此系统成功地~~地~~对 *Lactobacillus plantarum* 染色体上的的两种 *ldh* 基因进行了敲除，以验证双基因敲除对菌体细胞壁肽聚糖前体合成的影响。

Maleret C 等<sup>[51]</sup>利用 pRV300 型自杀质粒对 *Lactobacillus sakei* 的 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 进行敲除，在 *ldhL* 基因片段的中间插入氯霉素抗性片段进行后续的同源重组的筛选。具有红霉素抗性的突变株经验证后作为单交换突变株，一共挑选 548 株单交换菌株进行双交换的筛选，结果最终只筛选到一株成功将 *ldhL* 进行敲除的双交换株。发现对 *ldhL* 的敲除使该菌的 L 以及 D-乳酸的生产均被消除，从而间接证明该 *Lactobacillus sakei* D-乳酸的生产是有消旋酶对 L-乳酸的转化而来。

### 1.5.2 热敏型敲除系统

此系统是基于能够在敲除宿主中进行条件复制的复制子，即在低于某一温度下该质粒能够进行复制，而在高于某一温度条件下该质粒的复制将会被关闭。Maguin E 等<sup>[52]</sup>于 1992 年对广谱型复制子 pWV01 进行突变以筛选热敏型的突变子，结果筛选得到了一种突变质粒 pVE6002。对其进行在没有抗生素条件下的热敏性实验，发现该质粒在 37 度以上的温度下培养 8 h 后将会全部丢失，而在 30 度以下培养时几乎不会出现丢失。接着在此质粒上插入一段多克隆位点，构建便于进行克隆的载体 pVE6004。相比于自杀质粒系统，该系统具有较高的效率，敲除质粒导入宿主后在低温下可以让质粒复制获得大量的拷贝，因此不会受到阳性菌转化效率低的限制。同时，当这个质粒整合到染色体上后(第一次同源重组)，在低温下诱导质粒的复制将会促使更高的剪切效率。

Biswas I 等<sup>[53]</sup>于 1993 年对该套系统进行了实际验证，并且构建了大肠杆菌-乳酸菌穿梭敲除质粒 pG<sup>+</sup>host5 以便于在大肠杆菌中进行同源片段的克隆。研究发现，单交换发生的概率与同源片段的长度成对数相关，并且即使同源片段短至 330 bp 也能够成功

带格式的：字体：(默认) Times  
New Roman

的进行单交换将整个质粒整合到染色体上也能够成功地进行单交换即将整个质粒整合到染色体上。并且发现单交换菌株在 37.5 °C 下传代 75 次后,稳定性高于 99%,而在 28 °C 下则完全不稳定。同时研究了非选择性的双交换系统,在有选择标记(抗生素压力)时,50-98%单交换菌株进行了双交换,没有选择标记时,1-40% 进行双交换。同时研究了在单交换的基础上双交换效率,发现低温下质粒的复制可以使后续的剪切效率提高 100-1000 倍。

Gory L 等<sup>[54]</sup>尝试在 *Lactobacillus sakei* 中表达绿色荧光蛋白基因 *gfp* 以检测这种微生物在发酵产品中的表现。首先将融合有  $P_{lanL}$  启动子的 *gfp* 片段克隆到  $pG^{+}host5$  上进行质粒载体外源蛋白的表达。发现,在 30 °C 以下时,该载体是能够稳定表达 GFP 蛋白的。同时通过热敏性敲除质粒  $pG^{+}host5$  将 *gfp* 片段整合到染色体上进行表达,以半乳糖苷酶基因作为靶基因,将其置换成  $P_{lan-gfp}$  片段,获得能够稳定表达 GFP 的工程菌株。并且两种表达方式均不会对菌体的生长发酵产生影响。

Okano K 等<sup>[55]</sup>通过 pGhost9 敲除质粒成功地将对 *L. plantarum* 上的 D-乳酸脱氢酶基因(*ldhD*)进行了敲除,以产生光学纯的 L-乳酸。将基因 *ldhD* 起始密码子上游的 1 Kb 片段以及终止密码子下游的 1 Kb 片段克隆出来作为同源片段连接到  $pG^{+}host9$  上构建敲除载体,以对 *ldhD* 进行彻底的敲除。结果显示敲除菌株能够生产纯度达到 99.7%的 L-乳酸,并且其总乳酸产量并没有受到影响。同时,还将淀粉酶基因 *amyA* 克隆到载体 pCU 上进行表达,以淀粉为培养基进行直接发酵能产生高浓度的乳酸。

Takamatsu D 等<sup>[56]</sup>对  $pG^{+}host3$  进行改造,构建了一系列更加实用的猪链球菌敲除载体。在  $pG^{+}host3$  上插入来源于 pUC19 上的复制子以及多克隆位点以及壮观霉素抗性标记从而得到敲除载体 pSET4S。在大肠杆菌中培养温度为 37 °C 时该载体能够复制,从而便于同源片段的克隆,而在猪链球菌中 37 °C 时该载体不能够复制。实验证明,pSET4S 在 *S. equi* ssp. *equi* NCTC9682 中 28 °C 培养 8 h 后 38.2%的菌株仍具有抗性,而在 37 °C 培养 8 h 后仅有 0.05%具有抗性。最后用此质粒对 *S. equi* 的溶血素基因 *stx* 进行敲除(将其替换成氯霉素抗性基因),发现 2.6%的具有氯霉素抗性的突变株成功地通过双交换同源重组方式对具有氯霉素抗性的突变株成功地通过双交换同源重组方式对 *stx* 进行了敲除。

Tang YL 等<sup>[57]</sup>对 *Streptococcus suis* ZJ081101 的 SSU1356-ORF 序列进行分析,发现该基因片段所编码的由 201 个氨基酸组成的蛋白质与其他 *Streptococcus suis* 来源的 SodA 具有 81-88%的同源性。并用 pSET4S 敲除质粒对该基因进行了敲除,发现在突变株中已经检测不到 SOD 活力,证明敲除获得成功。实验发现突变株对过氧化氢所引起的氧化压力更加的敏感,并且突变株对小鼠的毒力也大幅度的下降。

域代码已更改

## 第 2 章 乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 中外源功能基因的表达

### 2.1 前言

乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 为本实验室在纤维素乙醇发酵过程中分离得到的一株耐高温,同时对木质纤维素预处理过程中产生的抑制物有较高耐受性的乳酸高产菌株。此菌对木质纤维素体系具有一定的依赖型,即在木质纤维素体系中的生长发酵行为要优于其他的培养基体系。它能够在 48 °C 的高温下进行正常的发酵,并且最高能够生产 100 g/L 以上的乳酸。并且此菌株能够利用葡萄糖进行同型乳酸发酵,即产物几乎全部是乳酸,基于糖的得率在 0.9 以上,没有其他副产物的产生,具有极大的构建纤维素乳酸生产工业生产模式的潜力<sup>[58, 59]</sup>。

生物炼制行业中纤维素酶的成本占整个过程成本的很大一部分,是生物炼制行业的限制环节,也是制约其工业化的瓶颈。因此,很多研究者都致力于降低生物炼制过程中酶的用量以及成本。比如进行纤维素酶的回收利用,提高酶的活力等等<sup>[60]</sup>。同时也可以对发酵菌株进行遗传改造,将纤维素酶的生产以及乳酸的发酵进行耦合,即构建纤维素乳酸发酵的整合生物过程(CBP)菌株。在乳酸发酵微生物中表达纤维素酶基因,让其具有降解纤维素为单糖的能力,然后利用单糖进行乳酸发酵,这样将会大大地降低整个过程的成本。

同时由于此菌株在木质纤维素体系中的特殊能力,我们可以对其进行代谢工程改造,从而生产其他的具有高附加值的平台基化学品。不管是表达纤维素酶基因还是进行代谢工程改造,都亟需在此野生菌株中构建一套有用的外源蛋白表达系统,为后续的工作奠定基础。本章在乳酸菌常用表达载体 pMG36e 的基础上建立适于 *P. acidilactici* DQ2 的表达系统。将 P<sub>32</sub> 启动子更换成来源于表达宿主本身的 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 的启动子 P<sub>*ldhL*</sub>, 获得新的表达载体 pTY36e。首先通过此载体成功地在 *P. acidilactici* DQ2 中表达了报告基因-来源于维多利亚多管发光水母的绿色荧光蛋白基因 *gfp*。随后将 β-葡萄糖苷酶基因 *bgIA* 克隆到新载体上转入 *P. acidilactici* DQ2 中,并在重组菌胞内检测到了明显的 β-葡萄糖苷酶酶活,证明我们成功地构建了一套适于 *P. acidilactici* DQ2 的外源蛋白表达系统。

## 2.2 实验材料

### 2.2.1 菌株与载体

大肠菌株 *E. coli* XLI-blue 以及 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保存, 多粘芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* 1.794 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 由本实验室分离获得, pMG36e 由实验室保存。

表 2.1 文中所用的菌种和质粒

Table 2.1 Bacterial strains and plasmids used in this paper

菌株及质粒 Bacterial strains or plasmids	相关特性 Relevant features	来源 Source or reference
菌株 Bacteria		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 thi-1 $\lambda$ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 $\Delta$ (argF <sup>-</sup> lacZYA) UI69f80dlacZDM15	Stored in the lab
<i>E. coli</i> XLI-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi, supE44, lac, hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), relA1	Stored in the lab
<i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2	Plasmid free strain	Chu DQ
<i>Bacillus polymyxa</i> 1.794		CGMCC
质粒 Plasmid		
pUC19	<i>Ori</i> pMB1, Amp <sup>r</sup> , MCS, <i>lacZ</i> $\alpha$ ; cloning vector	Stored in the lab
pPK2SurGFPD	Kan <sup>r</sup> , plasmid containing <i>gfp</i> gene	Lin LC
pUC19- <i>bglA</i>	Amp <sup>r</sup> , pUC19 derivative carrying <i>bglA</i>	Stored in the lab
pUC19-P <sub><i>ldhL</i></sub>	Amp <sup>r</sup> , pUC19 derivative carrying PCR product of P <sub><i>ldhL</i></sub>	This work
pMG36e	<i>Ori</i> pWVO1, Em <sup>r</sup> , MCS, P <sub>32</sub> promoter, expression vector	van de Guchte M
pTY36e	Em <sup>r</sup> , pMG36e while P <sub>32</sub> promoter was replaced by P <sub><i>ldhL</i></sub>	This work
pMG36e- <i>gfp</i>	Em <sup>r</sup> , pMG36e derivative carrying <i>gfp</i>	This work
pMG36e- <i>bglA</i>	Em <sup>r</sup> , pMG36e derivative carrying <i>bglA</i>	This work
pTY36e- <i>gfp</i>	Em <sup>r</sup> , pTY36e derivative carrying <i>gfp</i>	This work
pTY36e- <i>bglA</i>	Em <sup>r</sup> , pTY36e derivative carrying <i>bglA</i>	This work

带格式表格

带格式表格

### 2.2.2 主要试剂

高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶均购于 TaKaRa 公司(Takara Biotechnology Co. Ltd., Japan); 限制性内切酶购自 Fermentas 公司(Vilnius, Lithuania); 细菌基因组抽提试剂盒购自美国 Omega 生物工程公司 (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA); 质粒小抽试剂盒以及胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; PCR 纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp), 卡那霉素 (Kanamycin, Km), 壮观霉素(Spectinomycin, Spc), 红霉素(Erythromycin, Em), 万古霉素(Vancomycin, Vam), 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB), 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA), NAD<sup>+</sup>( Nicotinamide adenine dinucleotide)均购自北京普博欣生物科技有限公司; 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS), 异丙基- $\beta$ -D-巯基半乳-吡喃糖苷 (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyranoside,

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式的: 字体: Times New Roman

IPTG), 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside, X-gal)均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA); 西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain) 购自比利时 Acros Organics 化学公司 (Geel, Belgium); 胰蛋白胨 (Tryptone)和酵母提取物 (Yeast extract, YE) 购自英国 Oxoid 有限公司 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England); L-乳酸钠(Sodium L-Lactate), D-乳酸钠(Sodium D-Lactate), 对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside, PNPG)购自美国 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。其它药品、试剂如无特殊说明均购自上海凌峰化学试剂公司或上海国药化学试剂集团, 并都为分析纯。

引物合成与测序分别在上海捷瑞生物工程有限公司以及北京六合华大基因股份有限公司完成。

### 2.2.3 实验仪器

实验中所用到的所以仪器设备如表 2.2 所示。

表 2.2 主要实验仪器

Table 2.2 Experimental instruments

仪器名称	规格	生产厂家
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
PCR 仪	Mastercycler	Eppendorf 公司
电转化仪	GenePulserXce II <sup>TM</sup>	Bio-Rad 公司
小型高速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
微型摇床	5430	Eppendorf 公司
核酸蛋白分析仪	DU-800	Beckman 公司
水平电泳槽	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad 公司
电泳槽	Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad 公司
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
全自动紫外与可见分析装置	FR-200A	复日科技
高速冷冻离心机	Avanti J-26	Beckman 公司
漩涡混合器	QL-901	江苏海门市其林贝尔公司
手掌型离心机	LX-100	江苏海门市其林贝尔公司
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博讯实习有限公司医疗设备厂
超声波细胞破碎仪	JY92-II	宁波新芝生物科技有限公司
恒温水槽	SDC-6	宁波新芝生物科技有限公司
制冰机	XB-100	宁波格兰特制冷设备制造有限公司
恒温恒湿培养箱	GHP-9160	上海一恒科技有限公司

带格式表格

落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达有限公司
超声波清洗机	KWT-100A	科伟达超声波设备有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科技有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
冰箱	CD-239VC	海尔公司
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子

#### 2.2.4 培养基，主要溶液的配制

培养大肠杆菌所用培养基为 Luria broth (LB): 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl, 5 g/L 酵母提取物, 200 rpm/min, 37 °C。如需要配置固体培养基, 在配置好的液体培养基中添加 1.5% 的琼脂粉。培养带有质粒的大肠杆菌时, 在培养基中添加一定浓度的抗生素。氨苄青霉素的工作浓度为 100 µg/mL, 壮观霉素的工作浓度为 100 µg/mL, 红霉素的工作浓度为 150 µg/mL。在配置含有抗生素的平板时, 将添加有琼脂粉的培养基灭菌后冷却到 60 °C 左右, 然后添加相应的抗生素母液并倒入到无菌培养皿中, 冷却后保存在 4 °C 冰箱中备用。

乳酸片球菌培养条件为 42 °C, 150 r/min, 采用 MRS(葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 4 g/L, 牛肉膏 8 g/L, 乙酸钠 3 g/L, 柠檬酸氢二铵 2 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 七水硫酸镁 0.2 g/L, 一水硫酸锰 0.05 g/L, 吐温 80 1 mL/L)培养基, 带有质粒的乳酸片球菌培养温度为 37 °C, 并在培养基中添加 5 µg/mL 的红霉素。

**电转**乳酸片球菌**电转**所用复苏液: 在 MRS 培养基中添加 0.5 mol/L 的蔗糖, 121 °C 灭菌 20 min 待用。

核酸电泳缓冲液(5×TBE 贮存液): 54 g Tris 碱, 27.5 g 硼酸, 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 溶于 1 L 去离子水, 用时稀释 10 倍。

0.7% 的琼脂糖凝胶: 称取 0.7 g 琼脂糖于 100 mL 0.5×TBE 中, 并加入 20 µL EB 用微波炉加热 2 min, 倒入配置凝胶的模具中。

8 mM 对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG): 称取 0.0482 g 的 pNPG 干粉溶于 20 mL pH 为 7.8.0 的柠檬酸缓冲液中。

50 mg/mL 的溶菌酶溶液: 称取 0.25 g 溶菌酶干粉溶解于 5 mL pH 为 8.0 的 Tris-cl 缓冲液中, 溶解完全后用无菌的 0.22 µm 滤膜过滤分装, -20 °C 避光保存待用。

氨苄青霉素贮存液(50 mg/mL): 准确称取 0.50 g 氨苄青霉素粉末溶于 10 mL 超纯水中, 待完全溶解后用无菌的 0.22 µm 滤膜过滤分装, -20 °C 避光保存待用。壮观霉素以及万古霉素的配置方法与上述相同。

——红霉素贮存液(50 mg/mL): 准确称取 0.50 g 红霉素粉末溶于 10 mL 无水乙醇

带格式的: 缩进: 首行缩进: 0.85 厘米

中，待溶解完全后用无菌的 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤分装， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存待用。

蛋白电泳 SDS-PAGE 溶液：

1 M Tris-HCl 的 500 mL 贮存液：将 60.5 g Tris base 溶解在 350 mL 超纯水中，使 Tris 全部溶解，用超纯水定容至 500 mL，最后用盐酸将 pH 调节至 6.8， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

30% 丙烯酰胺溶液(AM)：购买的成品，直接使用。

SDS 溶液 (100 g/L)：将 10 g 高纯度的 SDS 加入到 100 mL 的超纯水中，置微波炉中加热溶解，并防止爆沸，隔段时间后用玻璃棒搅拌，待溶解完全后倒入玻璃试剂瓶中， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

溴酚蓝(10 g/L)溶液：称取 500 mg 溴酚蓝用 50 mL 超纯水溶解，棕色试剂瓶  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

75% (v/v)甘油：将 300 mL 分析纯甘油添加到 100 mL 的超纯水中，混匀后倒入试剂瓶中， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

4 $\times$ 堆积胶缓冲液 100 mL：4 mL 100 g/L SDS 溶液，50 mL 1M Tris-HCl，21 mL 的水，混匀后倒入试剂瓶中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

4 $\times$ 分离胶缓冲液 500 mL：依次量取 100 g/L SDS 溶液 20 mL，375 mL 2 M Tris-HCl，后用超纯水定容至 500 mL。混匀后倒入剂瓶中， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保存。

TEMED 成品液：将购买的成品液分装成每小份 2 mL， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

5 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer，5 mL：将 0.5 g 的 SDS、25 mg 的溴酚蓝加入到 1.25 mL 1 M Tris-HCl(pH=6.8) 中，并加入 2.5 mL 的甘油。最后用去离子水定容至 5 mL，分装成每小份 500  $\mu\text{L}$ ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。使用前每小份中加入 25  $\mu\text{L}$  的巯基乙醇。

10 $\times$ Tris-Glycine Buffer(电泳缓冲液) 1 L：将 10 g SDS，30 g Tris base，144 g 甘氨酸溶于 700 mL 的去离子水中，可用超声波仪促进溶解，待完全溶解后定容至 1 L。室温保存待用，pH 值约为 pH  $8.4\pm 0.1$ 。

100 g/L 过硫酸铵溶液 (ammonium persulfate, AP) 20 mL：称取 2 g 的过硫酸铵加到 20 mL 的去离子水中，待完全溶解后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。注意在使用时不要与 TEMED 发生交叉污染。

考马斯亮蓝 R-250 染色液 1 L：称取 1.0 g 的考马斯亮蓝 R250 于 1 L 的试剂瓶内，然后加入冰醋酸 100 mL、甲醇 450 mL 溶解，最后用去离子定容至 1 L。室温保存待用。

考马斯亮蓝染色脱色液：量取 100 mL 的醋酸、50 mL 的乙醇混匀，最后量取 850 mL 的去离子水倒入其中，混匀后室温保存待用。

分离胶的配制(12%)：AM 溶液，2 mL；分离胶缓冲液，1.25 mL；水，1.67 mL；TEMED，10  $\mu\text{L}$ ；AP，50  $\mu\text{L}$ 。

堆积胶的配制(5%)：AM 溶液，0.335 mL；堆积胶缓冲液，0.5 mL；水，1.15 mL；TEMED，5  $\mu\text{L}$ ；AP，30  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 β-葡萄糖苷酶基因 *bglA* 以及 L-乳酸脱氢酶基因启动子 $P_{ldhL}$ 的克隆

分别以 pUC19-*bglA* 质粒以及 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为模板，利用设计好的引物进行 PCR 扩增，实验中所用到的引物如下表 2.3 所示。

带格式的：字体：非加粗

表 2.3 引物序列及扩增片段

Table 2.3 Primers sequence used for construction of recombinant plasmids

引物	引物序列(5'-3')	扩增片段
<i>bglA</i> <sup>-</sup> -S	GCGAGCTCCTATGACTATTTTTCAATTTCCG( <i>Sac</i> I)	β-葡萄糖苷酶基因
<i>bglA</i> <sup>-</sup> -A	CCCAGCTTTTAGCGTCTAGTCTCCAACC( <i>Hind</i> III)	( <i>bglA</i> )(pMG36e- <i>bglA</i> )
<i>bglA</i> -S	GCTCTAGAATGACTATTTTTCAATTTCCG( <i>Xba</i> I)	β-葡萄糖苷酶基因
<i>bglA</i> -A	ACATGCATGCTTAGCGTCTAGTCTCCAACC( <i>Sph</i> I)	( <i>bglA</i> )( pTY36e- <i>bglA</i> )
$P_{ldhL}$ -S	CCGGAATCCCACCCATACTTTTTAGC( <i>Eco</i> R I)	$P_{ldhL}$ 启动子
$P_{ldhL}$ -A	GCTCTAGATATTAGATTATATATTTGGTCCACC( <i>Xba</i> I)	
<i>gfp</i> -S	GCTCTAGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA( <i>Xba</i> I)	绿色荧光蛋白基因( <i>gfp</i> )
<i>gfp</i> -A	ACATGCATGCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC( <i>Sph</i> I)	

带格式表格

带格式表格

PCR 反应体系的配置在冰上进行，组成如下表 2.4 所示。添加除酶液以外的组分，最后加入酶液，盖好盖子，用微型离心机离心 5 S，然后迅速放入 PCR 仪中进行扩增。

表 2.4 PCR 反应体系

Table 2.4 Composition of PCR

试剂名称	用量
无菌超纯水	33.0 μL
5×PCR buffer	10.0 μL
Forward primer (10 μM)	1.0 μL
Reverse primer (10 μM)	1.0 μL
dNTP mixture	4.0 μL
模板 DNA	0.5 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μL
Total volume	50.0 μL

带格式表格

带格式表格

带格式的：字体：非倾斜

*bglA* 基因的克隆：以质粒 pUC19-*bglA* 为模板，用引物 *bglA*-S 与 *bglA*-A 扩增 β-葡萄糖苷酶基因 *bglA*。PCR 反应条件：94 °C 3 min，94 °C 30 s，55 °C 15 s，72 °C 90 s，30 个循环，然后 72 °C 延伸 10 min。

$P_{ldhL}$  启动子的克隆: 通过 NCBI(编号: X70927.1)获取 *P. acidilactici* L-乳酸脱氢酶基因启动子序列并设计引物<sup>[61]</sup>, 以 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为模板, 用引物  $P_{ldhL-S}$  和  $P_{ldhL-A}$  扩增出启动子序列。PCR 反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 15 s, 72 °C 12 s, 30 个循环, 然后 72 °C 延伸 10 min。

*gfp* 基因的克隆: 以 pPK2SurGFPD 作为模板, 用引物 *gfp-S* 和 *gfp-A* 扩增绿色荧光蛋白基因 *gfp*。PCR 反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 58 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 然后 72 °C 延伸 10 min。

所有 PCR 产物经过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 以确定大小是否与预期的相符。检测正确后用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 取适量进行双酶切(与载体同时进行)。双酶切所用缓冲液根据 Fenmentas 公司说明书进行选择, 尽量使两种酶均处于最高活性, 双酶切时间一般在 5 h 左右。双酶切完成后进行切胶, 然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行 DNA 的回收。最后测定所得的 DNA 的浓度, 根据目的片段以及载体的浓度确定连接体系(目的片段与载体的摩尔比在 3:1-10:1 之间), 具体如下表 2.5 所示。

表 2.5 连接体系

Table 2.5 The ligation system

表达载体/ $\mu\text{L}$	目的基因/ $\mu\text{L}$	T4 DNA ligase/ $\mu\text{L}$	连接 buffer/ $\mu\text{L}$	总体积/ $\mu\text{L}$
V	8-V	1	1	10

将上述连接体系置于 16 °C 的水浴锅中连接 12-16 h, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养, 长出单菌落后挑取单菌落划线到新鲜的氨苄青霉素平板, 然后在此平板上刮取菌体进行菌落 PCR 验证。PCR 验证正确后提取该菌的质粒, 进行双酶切验证以及进行基因序列的测定。

大肠杆菌感受态细胞的制备:

- ① 从甘油管中挑取少量菌液划线到 LB 平板上, 37 °C 条件下过夜培养。
- ② 挑取单菌落接种到 20 mL 的液体 LB 培养基中过夜培养。
- ③ 以 1% 接种量接种到 100 mL 的液体 LB 培养基中, 当其 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6 后将菌液置于冰上放置 30 min。
- ④ 4 °C、4000 rpm/min 离心 10 min, 倒出培养液上清, 加入 30 mL 0.1 M 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液, 缓慢地用移液器吹打使菌体悬浮。
- ⑤ 4 °C、4000 rpm/min 离心 10 min, 倒掉上清, 加入 8 mL 0.1 M 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液以及 3.4 mL 50% 的甘油, 缓慢地用移液器吹打使菌体悬浮。
- ⑥ 冰浴 2 h, 以每管 80  $\mu\text{L}$  的量进行分装。
- ⑦ 用液氮进行速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存待用。

大肠杆菌的转化:

- ① 从 -80 °C 冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞, 在冰上解冻。

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式表格

- ② 将解冻后的感受态细胞取出加入到 10  $\mu\text{L}$  的连接体系中，混匀，冰置 30 min。
- ③ 将以上离心管置于 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中，热激 90 S。
- ④ 迅速取出后冰置 2 min，加入 900  $\mu\text{L}$  的 LB 培养基，置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、100 rpm/min 的培养箱中培养 45min，使细菌复苏并表达相关的抗性基因。
- ⑤ 取 200  $\mu\text{L}$  的以上转化液，涂布抗生素平板，37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养过夜。

### 2.3.2 重组表达载体 pMG36e-*bglA* 的构建、pMG36e 的改造以及 pTY36e-*bglA* 的构建

将 *bglA* 基因片段用相应限制性内切酶从克隆载体上切下，然后与用同样酶处理过的表达载体 pMG36e 连接(方法同前)，转化大肠杆菌 XL-blue(方法同前)并涂布含红霉素的 LB(LE)平板。长出菌落后挑取单菌落划线到另一块 LE 平板上，进行菌落 PCR 以及提取质粒双酶切验证，得到重组大肠杆菌 pMG36e-*bglA*。然后提取质粒转化乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2，菌落 PCR 鉴定，具体操作方法如下：在无菌离心管中加入无菌水 20  $\mu\text{L}$ ，用 10  $\mu\text{L}$  枪头从平板上挑取适量菌体并在无菌水中反复吹打，然后沸水浴 10 min，离心后取上清 1  $\mu\text{L}$  作为模板进行 PCR 扩增验证。将此重组菌命名为 *P. acidilactici* PT1。

*P. acidilactici* DQ2 的电转化感受态细胞的制备：乳酸片球菌的电转化方法参照文献报道<sup>[62]</sup>，并作一定的修改，具体如下。

- ① 从甘油管中挑取少量菌液划线到 MRS 平板上，42  $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜培养。
- ② 从平板上挑取单菌落接种到 20 mL 液体 MRS 培养基中，过夜培养。
- ③ 以 1% 的接种量将以上菌液接种到 20 mL 含 40 mM D,L-苏氨酸的 MRS 中，培养 4 h 左右。
- ④ 待 OD<sub>600</sub> 达到 1.0-1.2 之间，取 1 mL 菌液 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10000 rpm/min 离心 5 min
- ⑤ 去除上清，用 1 mL 缓冲液 I(0.6 M 蔗糖，7 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>，1 mM MgCl<sub>2</sub>，pH=7.5) 缓慢将菌体悬浮起来。离心，并重复一次。
- ⑥ 加入 100  $\mu\text{L}$  的缓冲液 I 悬浮菌体，并加入 10  $\mu\text{L}$  0.5 mg/mL 的溶菌酶，37  $^{\circ}\text{C}$  下处理 30 min。
- ⑦ 离心，并用缓冲液 I 洗涤 2 次，10000 rpm/min 离心 5 min，去除上清。
- ⑧ 用 500  $\mu\text{L}$  的缓冲液 II(0.5 M 蔗糖，10% 甘油)将菌体悬浮起来，并以每份 80  $\mu\text{L}$  的体积进行分装，用液氮进行速冻后置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待用。

乳酸片球菌的电转化：

- ① 从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出乳酸片球菌感受态细胞，在冰上解冻。
- ② 将感受态细胞与 10  $\mu\text{L}$  (1-5  $\mu\text{g}$ ) 的重组质粒混匀，并将其转移到 1 mm 的电击杯中，在 2000 V、200  $\Omega$ 、25  $\mu\text{F}$  (1 mm 电击杯) 条件下电击。
- ③ 迅速将菌液转移到 900  $\mu\text{L}$  预冷的复苏液中含 0.5 M 的 MRS)，冰置 5 min。
- ④ 将菌液转移到 42  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 2.5 h，取 200  $\mu\text{L}$  菌液涂布红霉素平板，3 d 左右长出转化子，挑取阳性克隆进行 PCR 验证。

将启动子片段 P<sub>idhL</sub> 用相应限制性内切酶从克隆载体上切下，与用相同酶处理过的 pMG36e (将 P<sub>32</sub> 启动子切掉) 连接得到 pTY36e (图 2.1)。将绿色荧光蛋白基因 *gfp* 片段用

相应限制性内切酶从克隆载体上切下，与用相同酶处理过的 pTY36e 连接并转化大肠杆菌 XL1-blue，鉴定后得到 pTY36e-*gfp*。提取质粒并转化乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2，鉴定，将此重组菌命名为 *P. acidilactici* PT2。

将 *bglA* 基因片段用相应限制性内切酶从克隆载体上切下，与用相同酶处理过的 pTY36e 连接并转化大肠杆菌 XL1-blue，鉴定后得到重组大肠杆菌 pTY36e-*gfp*(图 2.1)，提取质粒并转化乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2，鉴定，并将此重组菌命名为 *P. acidilactici* PT3。

将带有空载 pTY36e 的 *P. acidilactici* DQ2 命名为 PTC。

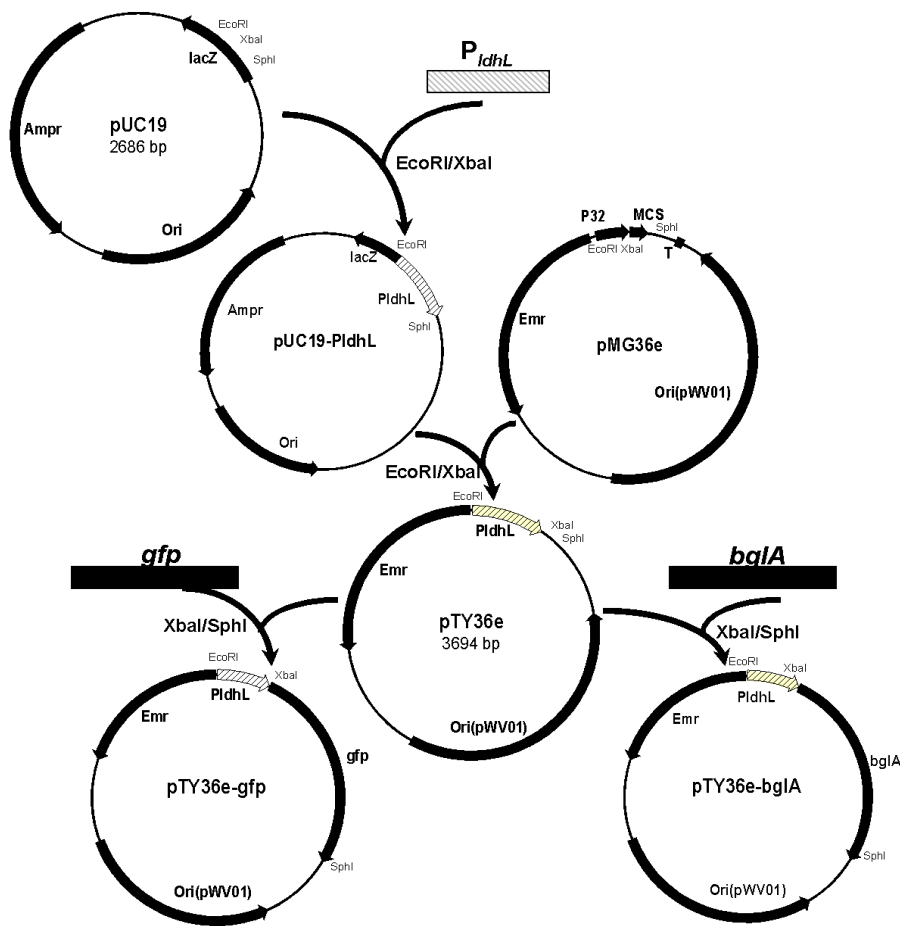


图 2.1 pMG36e 的改造及重组质粒载体构建路线图

Fig. 2.1 Modification of pMG36e and construction of recombinant plasmids

### 2.3.3 重组菌荧光检测

将 pMG36e-*gfp*、重组菌 PT2(pTY36e-*gfp*)和对照菌 PTC(pTY36e)培养至对数生长期，离心收集 1 mL 菌体，去除上清并用同样体积的 TES 缓冲液(50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 30

mM Tris, pH=8.0)悬浮、离心, 去除上清后再重复一次。然后用适量的 TES 缓冲液悬浮菌体, 荧光显微镜(激发光波长 488nm, OLYMPUS BX51, Tokyo, Japan)下观察菌体的荧光情况。

#### 2.3.4 重组乳酸片球菌 PT3 SDS-PAGE 电泳及分析

取 20 mL 的菌液离心并用柠檬酸缓冲液洗涤收集菌体细胞, 液氮研磨破碎细胞获得胞内粗酶液。取 50  $\mu$ L 上述粗酶液溶解在 50  $\mu$ L 2 $\times$ 的 SDS 缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 4% SDS, 20% 甘油, 2% 巯基乙醇)中, 与蛋白标准品一同沸水浴 5 min, 离心后取 10  $\mu$ L 上样进行 SDS-PAGE(5%的浓缩胶和 12%的分离胶)分析  $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达。

#### 2.3.5 重组菌 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定

从平板上挑取单菌落到添加有红霉素的 MRS 培养基中过夜培养获得种液, 然后以 10%的接种量接种到 20 mL MRS 培养基中, 待生长到对数中期后收获菌体( $OD_{600}=2.0$ 左右)。4  $^{\circ}$ C、10000 rpm/min 离心 5 min, 上清用硫酸铵分级沉淀法进行蛋白浓缩, 然后用柠檬酸缓冲液(pH=7.0)回溶, 得到分泌到细胞外的粗酶液。而加入同等体积的柠檬酸缓冲液(pH=7.0)悬浮离心所得的菌体, 离心后重复一次。然后将菌体转移到预冷的研钵中, 加入液氮进行研磨, 并重复三次, 直至菌体被研磨成白色的粉末状为止。然后将研钵置于冰上, 使菌体解冻, 加入 0.5 mL 的柠檬酸缓冲液将破碎后的菌体悬浮, 转移到 1.5 mL 的离心管中。再加入 0.5 mL 的柠檬酸缓冲液悬浮一次, 转移到离心管中, 4  $^{\circ}$ C、12000 rpm/min 离心 10 min, 将上清转移到另一个离心管中作为粗酶液进行酶活力的测定。

表 2.6  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定体系

Table 2.6 The  $\beta$ -glucosidase enzyme activity detection system

	样品管	酶空白	底物空白
粗酶液	0.2	0	0.2
底物(pNPG)	1.0	1.0	0
Buffer	0.8	1.0	1.8

带格式表格

$\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定采用对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)作为底物, 在  $\beta$ -葡萄糖苷酶的催化作用下将会生成对硝基苯酚, 而对硝基苯酚在 405 nm 处有最大吸收峰, 因此可以通过测吸光度的方法进行酶活的定量分析。1 单位的酶活(U)定义为在特定条件下在 1 min 之内释放出 1  $\mu$ mol 的对硝基苯酚所对应的酶量<sup>[63, 64]</sup>。

酶活测定体系组成如表 2.6 所示, 测定步骤如下: 先后在小试管中加入缓冲液以及底物, 37  $^{\circ}$ C 预热 2 min, 然后加入粗酶液, 置于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中进行反应 10 min, 迅速取出并加入 1 mL 0.5 M 的  $Na_2CO_3$  来终止反应, 最后在 405 nm 条件测定吸光度值。酶液反应后的吸光度值  $A=A_{\text{样品}}-A_{\text{酶空白}}-A_{\text{底物空白}}$ 。

酶活计算公式如下所示:

带格式的: 缩进: 首行缩进: 1.82 字符

$$U = \frac{C \cdot N}{10 \times 0.2} = 0.5C \cdot N \quad (2-1)$$

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2-2)$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot b} = 0.0532A \quad (2-3)$$

$$U(U/mL) = 0.0266N \cdot A \quad (2-4)$$

C: 对硝基苯酚的浓度,  $\mu\text{mol/mL}$

N: 稀释倍数

A: 吸光度值

E: 对硝基苯酚的摩尔消光系数,  $18.8 \text{ mmol/L cm}$

通过此公式计算出的酶活单位为 U/mL, 然后将其换算成 U/g dry cell, 其中 1 OD mL 的菌体干重为  $3.007 \times 10^{-4} \text{ g}$ 。

带格式的: 字体: 小四

## 2.4 结果

### 2.4.1 表达载体 pTY36e 的构建与荧光蛋白基因 *gfp* 的表达

首先试图利用已有的 pMG36e 载体表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglA*。通过 PCR 得到的多粘芽孢杆菌来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 片段, 大小为 1347 bp(图 2.2(a)), 测序结果表明所得序列正确。将该 *bglA* 基因片段连接到乳酸菌常用表达载体 pMG36e 上, 构建重组表达载体 pMG36e-*bglA*, 验证正确后(图 2.2(b))提取质粒电转入乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2。测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力发现, 重组菌 PT1 胞内和胞外均没有检测到酶活, SDS-PAGE 分析发现在预期位置并没有蛋白条带, 这些结果说明克隆到 pMG36e 上的 *bglA* 基因没有得到表达。

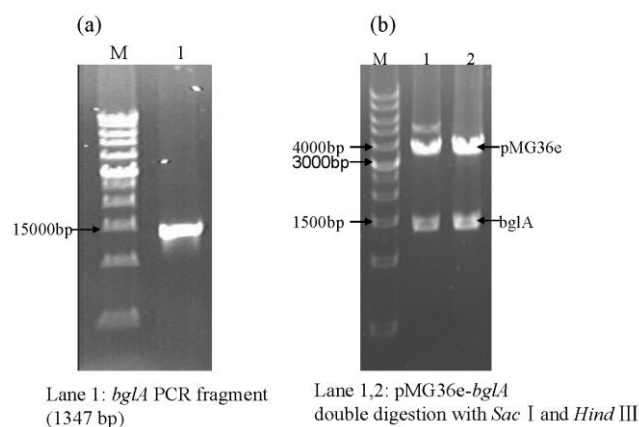


图 2.2 pMG36e-*bglA* 的构建

Fig. 2.2 Construction of pMG36e-*bglA*

绿色荧光蛋白(GFP)是从维多利亚多管发光水母 *Aequorea victoria* 中分离得到的一种蛋白,自从 1994 年首次被用作标记后已经成为生物科学领域最具革命性的报告蛋白,以它作为报告蛋白的好处在于不需要添加额外的底物或者能量,分析时不会产生干扰<sup>[65]</sup>。克隆得到此基因(图 2.3(a)),测序证明所得到的片段基因序列正确。构建 pMG36e-*gfp*,经过验证后(图 2.3(b))提取质粒并转入 *P. acidilactici* DQ2 中,以进一步验证 pMG36e 表达系统是否能够在乳酸片球菌中表达外源基因。结果在荧光显微镜下观察发现,该重组菌并没有荧光,说明通过 pMG36e 表达系统绿色荧光蛋白也不能够得到表达(图 2.5)。

pMG36e 是常见的乳酸菌表达载体,携带有组成型启动子 P<sub>32</sub> 推测可能是因为 P<sub>32</sub> 启动子在此宿主中活性太弱甚至不起作用,而一些研究者用 pMG36e 在乳酸菌中表达外源蛋白时也出现过同样的问题。Liang XB 等<sup>[41]</sup>利用 pMG36e 分别在启动子 P<sub>32</sub> 以及 P<sub>nis</sub> 作用下表达纳豆激酶,结果发现在 P<sub>32</sub> 作用下目的基因没有得到表达,而在 P<sub>nis</sub> 作用下得到了活性表达。Vannini V 等<sup>[66]</sup>运用 pMG36e 在乳酸乳球菌中表达一种甲基化转移酶时发现,目的蛋白的表达量非常低,并总结到 P<sub>32</sub> 启动子活性较弱,如果要高表达此基因就应该选用更加有效的启动子。而有报道称乳酸菌的 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 的启动子具有很强的活性<sup>[67]</sup>,所以试图从表达宿主 *P. acidilactici* DQ2 基因组中克隆出 *ldhL* 的启动子 P<sub>*ldhL*</sub>, 并以其替换 P<sub>32</sub>。

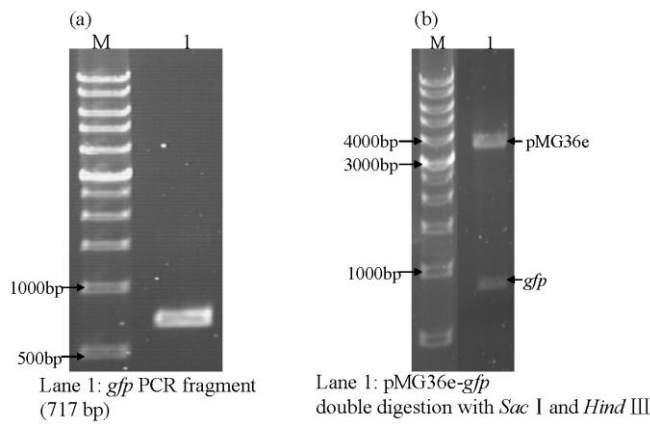


图 2.3 pMG36e-*gfp* 的构建

Fig. 2.3 Construction of pMG36e-*gfp*

从表达宿主 *P. acidilactici* DQ2 的基因组中克隆出了具有较高活性的 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)启动子,并以绿色荧光蛋白基因作为报告基因验证此启动子能否起作用。通过 PCR 扩增出 *P. acidilactici* DQ2 的 L-乳酸脱氢酶基因启动子片段 P<sub>*ldhL*</sub> 片段大小为 350 bp 左右(图 2.4(a)),与预期的大小相符。将 P<sub>*ldhL*</sub> 片段与克隆载体 pUC19 连接,得到 pUC19-P<sub>*ldhL*</sub>,测序结果表明所得序列正确。将 P<sub>*ldhL*</sub> 片段从 pUC19-P<sub>*ldhL*</sub> 上切下,与表达载体 pMG36e 连接,鉴定后得到新的表达载体质粒,并命名为 pTY36e,即将 P<sub>32</sub> 启动

子替换为  $P_{ldhL}$  启动子(图 2.1)。

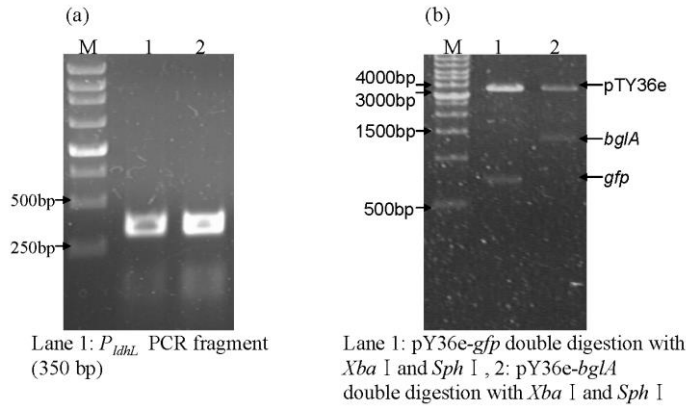
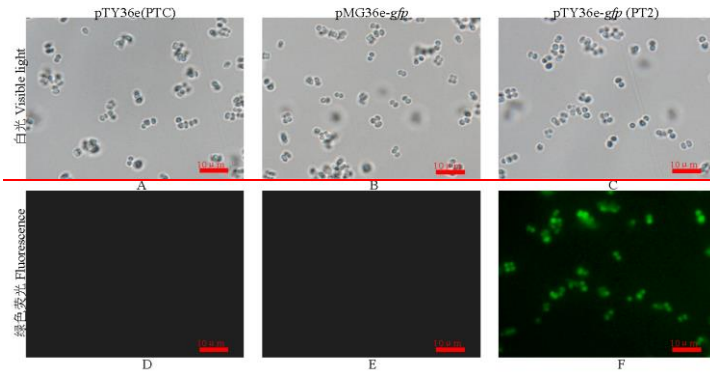


图 2.4 pTY36e-gfp、pTY36e-bglA 的构建

Fig. 2.4 Construction of pTY36e-gfp and pTY36e-bglA

带格式的: 字体: 非倾斜

将 *gfp* 片段与改造后的新表达质粒 pTY36e 连接, 得到 pTY36e-gfp。经双酶切验证正确后(图 2.4(b)), 电转入乳酸片球菌中。荧光显微镜观察发现, 携带有 pTY36e-gfp 质粒的重组菌 PT2 具有明显的绿色荧光, 而带有空质粒 pTY36e 的对照菌 PTC 没有荧光(图 2.5), 这说明在  $P_{ldhL}$  启动子作用下绿色荧光蛋白 GFP 在乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 中成功地得到了表达。



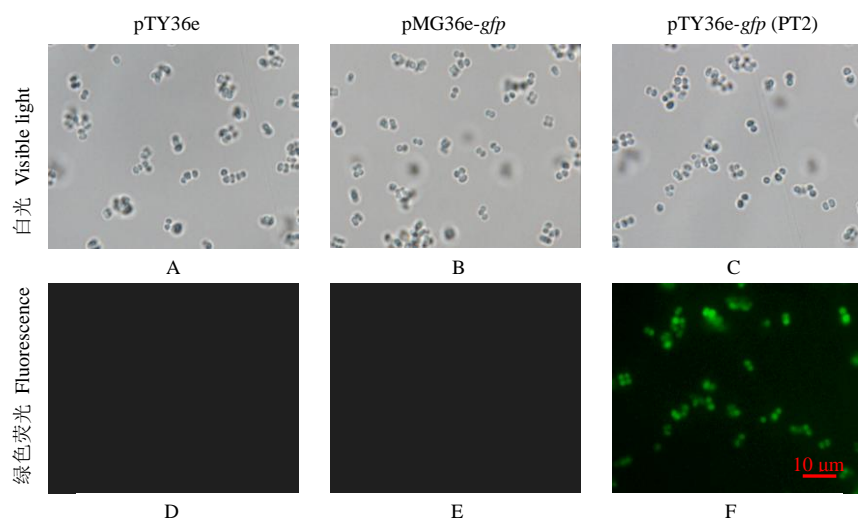


图 2.5 重组菌荧光检测

A: 对照菌(PTC) 在白光下检测, B: 重组菌 pMG36e-*gfp* 白光下检测, C: pTY36e-*gfp*(PT3)白光下检测, D: 对照菌(PTC)荧光检测, E: 重组菌 pMG36e-*gfp* 荧光检测, F: pTY36e-*gfp*(PT3)荧光检测

Fig. 2.5 Fluorescent detection of the recombinant strains

A: Control cells(PTC) were analyzed under visible light; B: pMG36e-*gfp* were analyzed under visible light; C: pTY36e-*gfp*(PT3) were analyzed under visible light; D: Control cells(PTC) were analyzed under fluorescence; E: pMG36e-*gfp* were analyzed under fluorescence; F: pTY36e-*gfp*(PT3) were analyzed under fluorescence

带格式的：居中

#### 2.4.2 表达载体 pTY36e-*bglA* 的构建以及 β-葡萄糖苷酶的表达

将 *bglA* 基因片段用 *Xba* I 和 *Sph* I 从质粒 pUC19-*bglA* 上双酶切切下并与用相同酶处理过的 pTY36e 连接,得到重组表达质粒 pTY36e-*bglA*,经双酶切验证正确后(图 2.4(b))电转入乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 中,得到重组菌 PT3。将重组菌进行细胞破碎后获得胞内粗酶液,并对该粗酶液进行 SDS-PAGE 分析(图 2.6),以确定 β-葡萄糖苷酶的表达情况。但是发现在 51.6 KDa(*bglA* 蛋白大小)的位置上对照菌株也有一条分子量相近的蛋白条带。由于本文建立的外源蛋白表达系统表达量相对有限,无法形成区别于宿主菌已有的近似分子量的蛋白条带。这一问题将在后续利用本文建立的方法表达其它特异性蛋白时进行进一步的确认。

带格式的：字体：小四

将重组菌 PT3 以及 PTC(对照)培养至对数生长期,离心收集菌体,离心所得的培养基上清用硫酸铵分级沉淀法收集蛋白质,即胞外粗酶液。所得菌体用柠檬酸缓冲液洗涤两次后用液氮研磨破碎细胞,然后用柠檬酸缓冲液悬浮、离心,得到的上清液作为细胞粗酶液。~~对上述得到的两类粗酶液进行酶活测定,具体测定方法见 2.3.4,每组实验都设定两个平行对照,结果见表 2.7。~~

带格式的：缩进：首行缩进： 0 字符

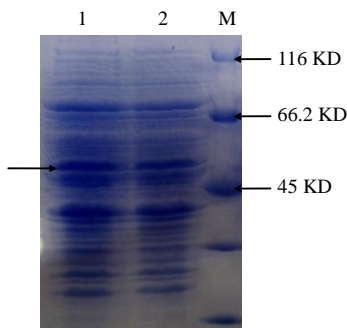


图 2.6 重组乳酸片球菌 PT3 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2.6 SDS-PAGE analysis of proteins in recombinant strain PT3

M: Molecular mass marker; 1: Negative control strain PTC; 2: The recombinant strain PT3

质粗酶液。对上述得到的两类粗酶液进行酶活测定，具体测定方法见 2.3.5，每组实验都设定两个平行对照，结果见表 2.7。

表 2.7 重组菌 β-葡萄糖苷酶活力测定

Table 2.7 β-glucosidase activity detection of the recombinant strain

	位置	底物	酶活力 U/(g dry cells)
重组菌 PT3	胞内	pNPG	4.48±0.71
	胞外	pNPG	0
对照菌 PTC	胞内	pNPG	0
	胞外	pNPG	0

该结果表明，重组菌 PT3 具有明显的 β-葡萄糖苷酶酶活，胞内酶活力为 4.48 U/(g dry cells)，而对照菌 PTC 无论胞内还是胞外均没有检测到酶活。说明改造后的表达载体 pTY36e 可以成功表达外源基因，因此我们成功地构建了可以在 *P. acidilactici* DQ2 中表达外源基因的表达质粒。另一方面，所表达的 β-葡萄糖苷酶蛋白主要分布在细胞质中，而胞外没有检测到相应酶活。因此，在乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 中可以成功表达来源于多粘芽孢杆菌的 β-葡萄糖苷酶蛋白，为进一步构建纤维素乳酸发酵的整合生物过程 CBP 细胞奠定了基础。

## 2.5 本章小结

(1) 本文在 *P. acidilactici* DQ2 中表达来源于多粘芽孢杆菌的 β-葡萄糖苷酶基因 *bglA*，将 *bglA* 基因置于表达载体 pMG36e 的 P<sub>32</sub> 启动子下游，基因没有得到明显的表达。我们推测，可能是由于 P<sub>32</sub> 启动子在此宿主菌中活性很弱或者根本不起作用所致。因此，我们对表达载体 pMG36e 进行了改造，将 P<sub>32</sub> 替换成来源于宿主菌 *P. acidilactici* DQ2 本身的 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 的启动子，并以 *gfp* 作为报告基因，荧光显微镜下观察到了明显的荧光 (图 2.5)，表明载体改造成功。

带格式的：两端对齐，缩进：首行缩进：0 厘米

带格式的：字体：五号，加粗，字体颜色：自动设置

带格式的：字体：五号，字体颜色：自动设置

带格式的：缩进：首行缩进：2 字符

带格式的：字体颜色：自动设置

带格式的：字体：五号，字体颜色：自动设置

带格式的：两端对齐，缩进：首行缩进：0 厘米

带格式的：两端对齐，缩进：首行缩进：0 厘米，行距：多倍行距 1.25 字行

带格式的：两端对齐，缩进：首行缩进：0 厘米

带格式表格

(2) 随后, 我们将来源于多粘芽孢杆菌的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因***bglA***连接到新载体 pTY36e 上进行表达, 并在细胞质中能够检测到明显的 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活, 酶活力为 4.48 U/(g dry cells)。这些结果进一步说明了 pTY36e 可以在乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 中起作用, 即我们成功地在该菌株中构建了一套可以表达外源基因的基因操作工具。并且可以在 *P. acidilactici* DQ2 中表达纤维素酶基因, 为进一步构建纤维素乳酸发酵的整合生物过程菌株(CBP 细胞)提供了可行的基础平台, 即可以分泌纤维素酶将纤维素降解为单糖, 然后利用单糖进行发酵生产相关产品的菌株。

### 第 3 章 *P. acidilactici* DQ2 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 的敲除

#### 3.1 前言

随着化石燃料的日益耗竭以及生态环境问题的日益突出, 人们急切地在寻找石油基化学品的替代物, 这些替代物必须能够同时兼有石油基化学品的功能以及环境友好等特点。比如在汽车驱动燃料方面, 燃料乙醇以及丁醇就是比较好的替代品。而在与人们生活密切相关的另一方面-塑料上, 目前最好的替代品就是聚乳酸(PLA), 因为聚乳酸具有生物可降解性所以不会给生态环境带来压力<sup>[68]</sup>。同时, PLA 的单体乳酸可以通过生物发酵的方法来生产, 并且通过生物发酵法可以获得化学合成法不能够达到的单一构型的乳酸<sup>[69]</sup>, 同时也不会向环境中排放各种有害物质以及二氧化碳。近年来, 对聚乳酸的

持续关注使得乳酸特别是通过生物发酵法所生产的乳酸产量大量的提升。

本实验室从纤维素乙醇发酵过程中分离得到的乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 具有很高的乳酸生产能力，但是其所产的乳酸为 D,L-混合型乳酸<sup>[58]</sup>，限制了产品的应用，因为作为聚乳酸 PLA 生产单体的乳酸必须具有非常高的光学纯度<sup>[70]</sup>。因此本章主要围绕构建能够生产单一构型乳酸的 *P. acidilactici* 菌株来进行。首先尝试通过对 *P. acidilactici* DQ2 基因组上负责将丙酮酸转化为 D-乳酸的 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 进行敲除，以达到生产光学纯的 L-乳酸的目的。通过热敏性敲除载体 pSET4E 进行靶基因的敲除，结果证明此系统能够成功的敲除 *ldhD* 基因，使突变株能够生产纯度高达 99.88% 的 L-乳酸。

### 3.2 实验材料

#### 3.2.1 菌株与载体

表 3.1 文中所用的菌种和质粒

Table 3.1 Bacterial strains and plasmids used in this paper

菌株及质粒 Bacterial strains or plasmids	相关特性 Relevant features	来源 Source or reference
菌株 Bacteria		
<i>E. coli</i> XLI-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi, supE44, lac, hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), relA1	Stored in the lab
<i>P. acidilactici</i> DQ2	Plasmid free strain	Chu DQ
<i>P. acidilactici</i> Δ <i>ldhD</i> 112	<i>ldhD</i> deficient strain	This work
质粒 Plasmid		
pUC19	<i>Ori</i> pMB1, Amp <sup>r</sup> , MCS, <i>lacZα</i> ; cloning vector	Stored in the lab
pSET4S	<i>Ori</i> ColE1/repA Ts, Spc <sup>r</sup> , temperature sensitive knockou vector	Takamatsu D
pSET4E	Em <sup>r</sup> , pSET4S while Spc <sup>r</sup> marker was replaced by Em <sup>r</sup>	This work
pSET4E-Δ <i>ldhD</i>	Em <sup>r</sup> , <i>ldhD</i> knockout plasmid for <i>P. acidilactici</i> DQ2	This work

- 带格式的：左
- 带格式表格
- 带格式的：左
- 带格式的：左
- 带格式的：左
- 带格式的：字体：五号
- 带格式的：左，缩进：首行缩进：1 字符
- 带格式的：左
- 带格式的：左
- 带格式的：左
- 带格式的：左
- 带格式的：左

乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 由本实验室筛选获得，pSET4S 质粒由中山大学陈瑶生教授惠赠。

#### 3.2.2 实验试剂、仪器

同 2.2.2 以及 2.2.3。

#### 3.2.3 培养基，主要溶液的配制

培养基以及各种菌的培养条件同 2.2.3.4。培养带有 pSET4S 质粒的大肠杆菌时在 LB 培养基中添加 200 μg/mL 的壮观霉素，培养带有 pSET4E 质粒的乳酸片球菌时在 MRS 培养基中添加 5 μg/mL 的红霉素，并且培养温度为 28 °C。

- 带格式的：字体：小四
- 带格式的：字体：小四

Bradford 蛋白定量溶液如下：~~+~~ ~~???~~

Bradford 贮液：称取 350 mg 的考马斯亮蓝粉末于棕色的储液瓶中，量取 100 mL 95% 的乙醇以及 200 mL 88% 的磷酸倒入瓶中，摇晃至完全溶解，4 °C 避光保存待用。

Bradford 工作液：量取 30 mL Bradford 贮液以及 15 mL 95% 的乙醇、30 mL 88% 的磷酸以及 425 mL 双蒸水于棕色容量瓶中，摇匀常温避光保存待用。

### 3.3 实验方法

#### 3.3.1 热敏性载体 pSET4S 的改造

~~【】pSET4S 是一种热敏性敲除质粒，最早由日本学者于 2001 年构建<sup>[50]</sup>，主要用于猪链球菌基因组上基因的敲除。相比于常用的自杀质粒，它具有很大的优点。用常规自杀质粒进行基因敲出时，为了保证敲除效率就必须要求有很高的外源质粒的转化效率，而对于革兰氏阳性菌，特别是某些比较难转化的菌来说，提高转化效率是比较困难的。而这种热敏性的质粒就能很好的解决这个问题，将敲除质粒转入宿主菌后，在低温下敲除质粒将会大量的复制以保证有足够多的拷贝。然后将培养温度提高，质粒的复制将会被关闭从而启动同源重组的发生。另外的一个优点就是，当敲除质粒整合到基因组上后启动质粒的复制，质粒的复制将会大大的提高剪切效率即敲除过程的第二步的效率，从而提高基因敲出的效率。这种热敏性的敲除质粒已经得到验证，具有较高的敲除效率。同时，也有一些研究者用此敲除系统成功的对乳酸菌基因组上的特定基因成功的进行了敲除。如日本学者 Okano K 等<sup>[49]</sup>运用与 pSET4S 类似的敲除系统成功的对 *Lactobacillus plantarum* 的 L 乳酸脱氢酶基因进行了敲除，从而消除了 L 乳酸的生成，达到了生产光学纯度的 D 乳酸的效果。】这一段在这里不合适，移到下面的结果部分较好~~

在前期的预实验中发现，本株乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2 对壮观霉素具有很高的抗性(>150  $\mu\text{g/mL}$ )，这对于后续实验是非常不利的，所以考虑将 pSET4S 上的壮观霉素抗性基因更换成乳酸片球菌非常敏感的红霉素抗性。首先通过 PCR 扩增得到红霉素基因片段，PCR 扩增体系同上面章节中保持一致，PCR 程序如下：

以 pMG36e 质粒作为模板，用引物 Em-S 和 Em-A(如下表 3.3)扩增红霉素抗性基因 *Em*。PCR 反应条件：94  $^{\circ}\text{C}$  3 min，94  $^{\circ}\text{C}$  30 s，55  $^{\circ}\text{C}$  15 s，72  $^{\circ}\text{C}$  1 min，30 个循环，然后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

将 PCR 获得并进行纯化后的 *Em* 基因片段以及 pSET4S(*Spc* 抗性基因被切掉)进行 *Spe* I 单酶切，然后切胶回收目的片段。由于载体进行的是单酶切，为了避免连接过程

带格式的：字体：倾斜

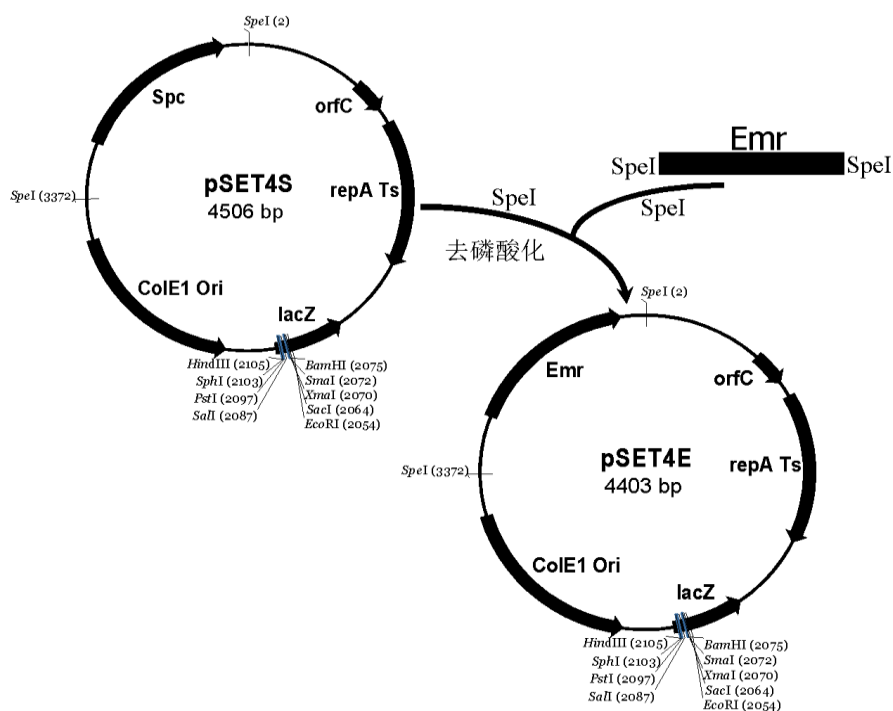


图 3.1 敲除质粒 pSET4S 的改造

Fig. 3.1 Modification of knockout plasmid pSET4S

免连接过程中载体发生自连，对单酶切后的载体进行去磷酸化。去磷酸化体系如下表 3.2 所示，在 PCR 仪中设定程序进行反应，65 °C 反应 10 min，反应结束后用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。最后进行目的片段与载体的连接，转化大肠杆菌 XL1-blue，挑选阳性菌落进行菌落 PCR、提取质粒等鉴定。

表 3.2 去磷酸化反应体系

Table 3.2 Dephosphorylation system of *Spe* I digested pMG36e

试剂名称	用量
DNA	30 μL
10×BAP buffer	5 μL
碱性磷酸裂解酶	2 μL
无菌超纯水	13 μL
总体系	50 μL

带格式表格

带格式表格

### 3.3.2 敲除质粒 pSET4E-Δ*ldhD* 的构建

以改造后的载体 pSET4E 作为骨架，分别将克隆得到的 D-乳酸脱氢酶基因的上下游同源臂连接到其多克隆位点上。上游同源臂克隆的是 D-乳酸脱氢酶基因起始密码子上游的 1 Kb 大小的基因片段，而下游同源臂克隆的是 D-乳酸脱氢酶基因终止密码子下

游的 1 Kb 大小的基因片段。有研究表明<sup>[53]</sup>，同源片段的长度在 370 bp 左右时，即有较高的重组效率。因此，1 Kb 长度的上下游同源片段将会获得理想的同源重组效率。

表 3.3 敲除质粒构建以及基因敲除验证中所用引物序列

Table 3.3 Primers sequence used for construction of recombinant plasmids and for gene knockout confirmation

引物	引物序列(5'-3')	扩增片段
UP-S	CCC <u>G</u> AAGCTTATGGAAGTTAAGTTAAATGCTGAC( <i>Hind</i> III)	上游同源臂
UP-A	CGCGGATTCGTAAATATTACCCCTTCTTTTTTA( <i>Bam</i> H I)	
DOWN-S	CGCGGATTCTTTTCTGCTTGAAATGAGTTTTA ( <i>Bam</i> H I)	下游同源臂
DOWN-A	CCGGAATTCATTATGAAACCGTAAAAAAGGC( <i>Eco</i> R I)	
Em-S	GGACTAGTAGTTATGCATCCCTTAACTTAC( <i>Spe</i> I)	红霉素抗性基因
Em-A	GGACTAGTTCGACCCATATTTAAAAAGC( <i>Spe</i> I)	
RepA-S	CGTATCTATGGCTGTCAGTCC	pSET4E 上
RepA-A	GTATTTCTCCTTACGCATCTG	RepA 片段
ldhD-S	CATATCGAGGTTAAAGCGGTC	D-乳酸脱氢酶基因核心区
ldhD-A	GTCCCGTTGTTGTCTAAGG	

先通过 *Hind* III 和 *Bam*H I 两个酶切位点将上游同源臂片段连接到 pSET4E 上，转化大肠杆菌 XL1-blue，鉴定获得阳性菌株。然后提取 pSET4E-UP 质粒，通过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 两个酶切位点将下游同源臂基因片段连接到 pSET4E-UP 质粒，转化大肠杆菌 XL-blue，鉴定获得阳性菌株。至此，成功地获得了 D-乳酸脱氢酶基因敲除质粒 pSET4E-UP-DOWN，即 pSET4E- $\Delta$ ldhD。其中上下游同源臂的 PCR 扩增条件如下：

上游同源臂：以 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为模板，用引物 UP-S 和 UP-A 扩增上游同源臂片段。PCR 反应条件：94 °C 3 min，94 °C 30 s，57 °C 15 s，72 °C 1 min，30 个循环，然后 72 °C 延伸 10 min。其中，PCR 产物的纯化以及酶切条件同上面一章。

下游同源臂：以 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为模板，用引物 DOWN-S 和 DOWN-A 扩增下游同源臂片段。PCR 反应条件：94 °C 3 min，94 °C 30 s，59 °C 15 s，72 °C 1 min，30 个循环，然后 72 °C 延伸 10 min。

### 3.3.3 D-乳酸脱氢酶基因敲除单交换菌株的筛选

单交换的进行参考文献报道并作一定的修改<sup>[71, 72]</sup>，主要包括以下步骤：首先，从大肠杆菌中抽提足够浓度的敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD；然后通过电转化将质粒导入到感受态的 *P. acidilactici* DQ2 中，筛选含有敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD 的 *P. acidilactici* DQ2。*P. acidilactici* DQ2 的电转化方法同上面一章，涂布红霉素平板 3 天左右后，平板上长出单菌落。挑 8 个单菌落划线到新的红霉素平板上，待长好后接种到液体培养基中进行培养，抽提质粒进行验证。革兰氏阳性菌由于细胞壁比较厚，所以不能采用革兰氏阴性菌的质粒抽提方法。具体步骤如下，用细菌质粒小提试剂盒中的溶液 I 将离心去上清后的菌体悬浮，并加入一定量的溶菌酶溶液，使终浓度为 10 mg/mL，37 °C 反应 30 min。然后按

带格式的：两端对齐

带格式表格

带格式表格

照试剂盒中的操作说明书进行操作，通过此方法能够获得较好效果。然后取适量的质粒溶液进行鉴定，确定阳性菌株；最后进行单交换菌株的筛选，具体步骤如下：

- ① 从平板上挑取 pSET4E- $\Delta$ ldhD/-*P. acidilactici* DQ2 单菌落菌株，接种到含有 5  $\mu$ g/mL 红霉素的 MRS 培养基中，28  $^{\circ}$ C、150 rpm 条件下培养到对数期。
- ② 以 1% 的接种量将上述菌液接种到含有 5  $\mu$ g/mL 红霉素的 MRS 培养基中，37  $^{\circ}$ C、150 rpm 条件下培养到稳定期。
- ③ 将上述菌液稀释  $10^6$  倍后涂布含有红霉素的 MRS 平板 37  $^{\circ}$ C 培养，筛选具有抗性的突变株。
- ④ 抽提具有红霉素抗性菌株的基因组，以引物 RepA-S/ RepA-A 以及 UP-S/ DOWN-A 进行 PCR 扩增，以确定整个敲除质粒是否已经整合到 *P. acidilactici* DQ2 基因组上了。单交换示意图如下图 3.2 所示。

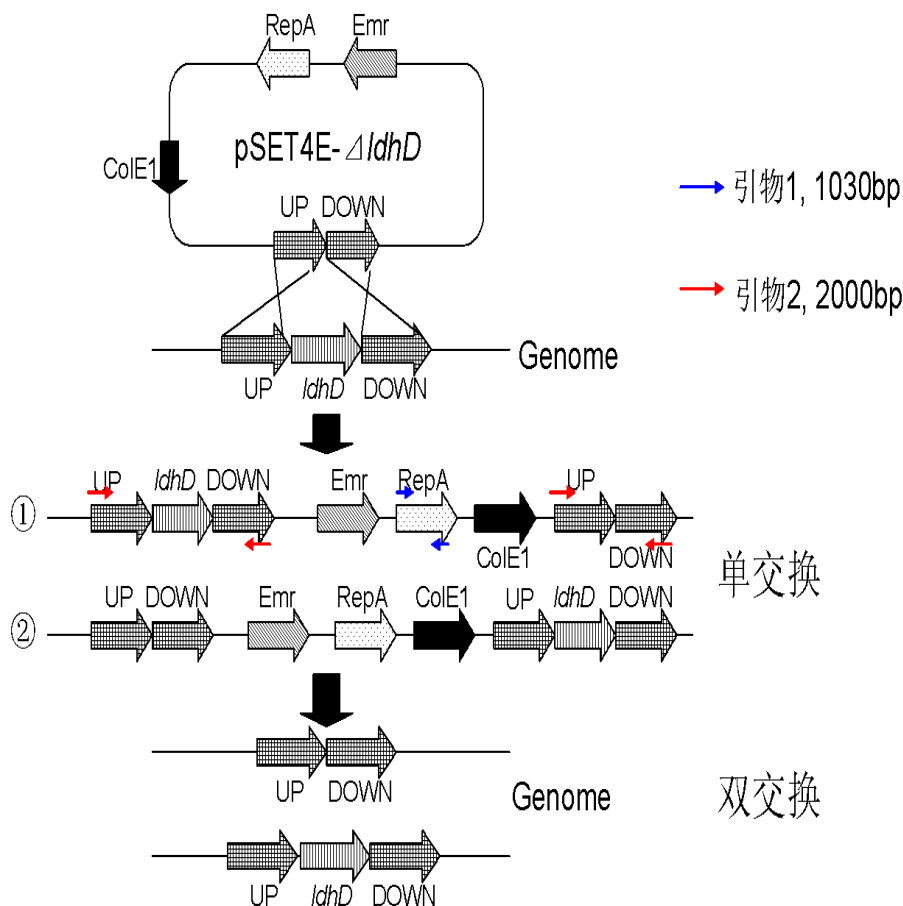


图 3.2 基因敲除示意图【图太小，不清楚】

Fig. 3.2 The map of *ldhD* knockout process

### 3.3.4 D-乳酸脱氢酶基因敲除双交换菌株的筛选

待验证确定获得发生单交换的菌株后，从平板上挑取单菌落接种到含有 20 mM 的 D,L-乳酸(防止 D-乳酸的消除对菌体生长造成影响)<sup>[50]</sup>的 MRS 培养基中(无抗生素)，于 28 °C、150 rpm 条件下培养到稳定期，获得第一代培养液。将培养液稀释一定倍数后涂布无抗生素的 MRS 平板，同时对培养液进行甘油保种。待平板上长出菌落后，挑单菌落接种到含有红霉素的 MRS 平板上同时也接种到无抗生素的 MRS 平板上，筛选不具有红霉素的突变株。

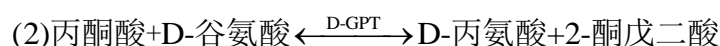
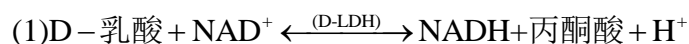
在进行上述涂板以及保种的同时，将培养液以 1% 的接种量接种到新鲜的 MRS 培养基中，相同条件培养以获得第二代培养液。长到稳定期后，保种并涂平板进行与第一代相同的筛选工作。同时接种到新鲜 MRS 中进行培养，从而获得第三代的培养液。一共传代 10 次为止，如果发现在培养过程中发生染菌，取出上一代的保种液重新进行接种培养。

将筛选得到的不具有红霉素抗性的菌株划线到新鲜的 MRS 平板上，长好后接种到液体培养基中收获菌体抽提基因组进行 PCR 扩增验证。通过两对引物进行 PCR 验证，ldhD-S/ldhD-A 以及 UP-S/ DOWN-A。

### 3.3.5 乳酸构型的测定

乳酸构型的测定采用 Megazyme 公司的 K-DLATE D/L-乳酸试剂盒测定。

D-乳酸的定量测定需要进行两步反应，首先 D-乳酸脱氢酶(D-LDH)在  $\text{NAD}^+$  存在的条件下将 D-乳酸催化成丙酮酸(1)。为了确保第一步反应反应完全，须将丙酮酸消耗掉。因此，在大量 D-谷氨酸存在的条件下，通过 D-谷氨酸-丙酮酸转氨酶(D-GPT)可以将丙酮酸转化为 2-酮戊二酸和 D-丙氨酸(2)。D-乳酸的量可以通过两步反应中所生成的



NADH 来进行换算，而 NADH 的量可以通过  $\text{OD}_{340}$  来进行测量。同理，L-乳酸在 L-乳酸脱氢酶的作用下转化为丙酮酸，第二步反应则相同。具体测定步骤如下表 3.4 所示。

表 3.4 乳酸构型检测步骤

Table 3.4 Procedure for detection the configuration of lactic acid

加入比色皿中的物质	空白	样品
蒸馏水 (25 °C)	1.60 mL	1.50 mL
样品溶液	-	0.10 mL
溶液 1 (双甘氨酸缓冲液)	0.50 mL	0.50 mL
溶液 2 ( $\text{NAD}^+$ )	0.10 mL	0.10 mL
悬浮液 3 (D-GPT)	0.02 mL	0.02 mL
混合，约 3 min 后读取溶液吸光度值 ( $A_1$ )，然后加入以下物质开始反应：		
悬浮液 5 (D-LDH)	0.02 mL	0.02 mL

混合，反应结束后（约 5 min）读取溶液吸光度值（ $A_2$ ）。

D-以及 L-乳酸浓度的计算如下所示：

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D-乳酸} \text{ g/L} \quad (3-1)$$

V 为终体积=2.24 mL；MW=D-乳酸的分子量； $\varepsilon$  为 340 nm NADH 的消光系数=6.22 mL/ $\mu$ mol cm；d 为光路=1 cm；v 为样品体积=0.1 mL； $\Delta A_{D-乳酸}=A_2-A_1$ （一般  $\Delta A_{D-乳酸}>0.1$  才能保证实验结果比较准确）。

D 以及 L-乳酸浓度为：

$$C = \frac{2.24 \times 90.1}{6300 \times 1 \times 0.1} \times \Delta A_{D-乳酸} \text{ g/L} = 0.3204 \times \Delta A_{D-乳酸} \text{ g/L} \quad (3-2)$$

D 以及 L-乳酸的纯度计算公式如下：

$$\begin{aligned} \text{D-乳酸}(\%) &= \frac{\text{D-乳酸}}{\text{D-乳酸} + \text{L-乳酸}} \times 100\% \\ \text{L-乳酸}(\%) &= \frac{\text{L-乳酸}}{\text{D-乳酸} + \text{L-乳酸}} \times 100\% \end{aligned} \quad (3-3)$$

### 3.3.6 乳酸脱氢酶酶活的测定

乳酸脱氢酶酶活的测定原理与上述测定乳酸构型的类似，只不过酶活测定时只进行以上的第一步反应，并且测定反应的初速度，然后通过 NADH 在 340 nm 处吸光值的变化速率即可换算得到酶的活力<sup>[73, 74]</sup>。

具体步骤为：将菌液培养到对数期后 10000 rpm $\times$ 10 min 离心收集菌体，并用磷酸缓冲液(pH=7.0)洗涤两次，液氮研磨破碎细胞，然后加入 1 mL 的磷酸缓冲液(pH=7.0)悬浮，4  $^{\circ}$ C 条件下 12000 rpm 离心 10 min，所得到的上清即可作为酶活测定的粗酶液。酶活测定体系如下表 3.5 所示。

**表 3.5 乳酸构脱氢酶酶活测定步骤**

Table 3.5 Procedure for detection the activity of lactic dehydrogenase

加入比色皿中的物质	所加入的样品体积
10 mM Tris-cl (pH=8.0) <sup>a</sup> /40 mM Tris-cl(pH=9.0) <sup>b</sup>	0.6 mL
750 mM D-乳酸钠 <sup>a</sup> /750 mM L-乳酸钠 <sup>b</sup>	0.2 mL
0.1 M NAD <sup>+</sup>	0.1 mL
用以上混合液进行吸光度测定的空白对照	
粗酶液	0.1 mL
加完粗酶液后迅速放入 DU800 中进行 340 nm 处吸光度值的读取	

a: L-乳酸脱氢酶酶活测定， b: D-乳酸脱氢酶酶活测定

带格式的：缩进：首行缩进： 0 字符

带格式的：字体：Times New Roman

带格式表格

——吸光度值的测量在 BECKMAN DU800 上进行，运用仪器上的 Kinetics/Time 程序进行连续读数，将读数间隔设定为 3 S，读数总时长设定为 600 S，整个反应在室温下进行。将所得到的数据绘制成一条平滑的曲线，并通过此曲线计算出初始反应速率最开始的几个点出的斜率 K。然后通过以下公式来计算酶活力(U/mL):

$$\text{Activity(U/mL)} = \frac{|K_{340}| \times V}{\epsilon \times d \times V_s} = 1.613 |K_{340}| \quad (3-4)$$

其中 V 为总反应体积=1 mL; |K<sub>340</sub>|为吸光度曲线的斜率; ε 为 NADH 的摩尔消光系数=6.22 mL/μmol cm; d 为比色皿光程=1 cm; Vs 为加入样品体积=0.1 mL。

### 3.3.7 蛋白浓度的测定

蛋白量的测定采用 Bradford 法，这是一种迅速、可靠地通过染色法测定溶液中蛋白质的方法<sup>[75]</sup>。此法的优点是快速，反应时间仅需 2 min，另外也比较敏感，最小测量蛋白质量为 2.5 μg 几乎没有蛋白质的损失。

这一方法是基于考马斯亮蓝 G250 有红、蓝两种不同颜色的形式，在一定浓度的乙醇及酸性条件下，可配成淡红色的溶液，当与蛋白质结合后，产生蓝色化合物，反应迅速而稳定，反应化合物在 465-595 nm 处有最大的光吸收值，化合物颜色的深浅与蛋白浓度的高低成正比关系，因此可检测 595 nm 的光吸收值的大小计算蛋白的含量。

标准曲线的绘制：标准曲线的绘制用的是 1 mg/mL 的牛血清白蛋白作为标准品，并且在测量的时候应当先测量低蛋白浓度的样品，以避免因 Bradford 染料吸附在比色杯上不能彻底冲洗干净而带来的误差。具体测量方法如下表 3.6 所示。

表 3.6 蛋白浓度测量标准曲线测定

Table 3.6 The standard curve of the detection of protein concentration

样品号	蛋白量	标准溶液		Bradford 试剂 /mL	A <sub>595</sub>
		(1mg/mL BSA)/mL	超纯水/μL		
1	0	0	200	2	0
2	10	10	190	2	0.2541
3	10	10	190	2	0.2801
4	15	15	185	2	0.3510
5	15	15	185	2	0.3626
6	20	20	180	2	0.4708
7	20	20	180	2	0.4614
8	25	25	175	2	0.5809
9	25	25	175	2	0.5337

带格式的：字体：Times New Roman

带格式表格

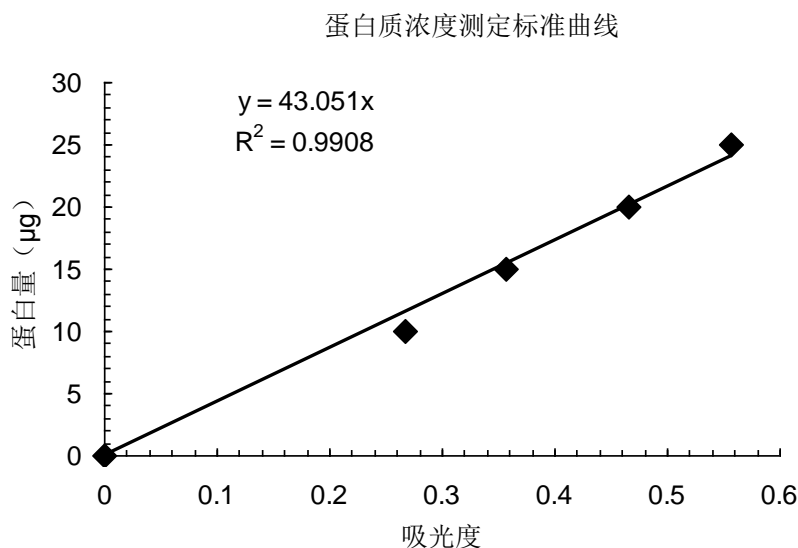


图 3.3 蛋白浓度测量标准曲线

Fig. 3.3 The standard curve of the protein concentration

样品的测量与标准曲线的绘制类似，样品的加入量不会超过 200  $\mu\text{L}$ ，一般取三个不同的体积进行测定，10、15、20  $\mu\text{L}$ ，如果测定结果偏小，将样品的加入量提高。

### 3.3.8 *P. acidilactici* DQ2 以及 *P. acidilactici* $\Delta\text{ldhD}$ 112D-乳酸脱氢酶基因敲除菌株对万古霉素抗性实验

对于大多数细菌而言，其细胞壁肽聚糖前体肽链的最后一位氨基酸一般为丙氨酸。而一些研究者的研究发现，在少数乳酸菌里，肽链最后一位的丙氨酸被 D-乳酸所替代。由于这一特性使这乳酸菌拥有对万古霉素的抗性，一般在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上<sup>[50]</sup>。

~~万古霉素是一类糖肽类抗生素，它通过与细胞壁肽聚糖的前提形成复合物从而阻碍细胞壁的合成，因此会抑制细菌的生长。如果肽聚糖前体的结尾氨基酸 丙氨酸被 D-乳酸所代替的话，就会降低万古霉素与肽聚糖前体的结合度，从而使此类细菌对万古霉素具有天然的抗性。~~

~~——Ferain T 等<sup>[44]</sup>人在对植物乳杆菌 *L. plantarum* NCIMB8826(野生型)进行研究时发现，该菌对万古霉素的抗性在 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上。并且也对其细胞壁肽聚糖的成分进行了分析，发现野生菌株大部分的肽聚糖前体最后一位是 D-乳酸而不是丙氨酸。当对该菌株的 D-乳酸脱氢酶基因进行敲除后，突变株对万古霉素的抗性急剧的下降，在 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右。对突变株的细胞壁成分进行分析后发现，以 D-乳酸结尾的肽聚糖的含量大量的减少，而丙氨酸结尾的肽聚糖的含量大量的升高。~~

~~——本株 *P. acidilactici* DQ2 是在纤维素乙醇发酵过程中分离得到的一株抗逆性非常强的菌株，对木质纤维素预处理过程中产生的抑制物具有很高的抗性。因此，怀疑该菌也~~

带格式的：字体：非加粗

可能对万古霉素具有较高的抗性。初步打算对野生菌株的抗性研究的抗生素浓度梯度定为 5、50、100、200、250  $\mu\text{g/mL}$ ，同时以另外一种模式乳酸菌 *L.lactis* MG1363 作为对照。

### 3.3.9 *P. acidilactici* DQ2 以及 *P. acidilactici* $\Delta\text{ldhD}$ 112D-乳酸脱氢酶基因敲除菌株的生长状况实验

野生 *P. acidilactici* DQ2 在 42  $^{\circ}\text{C}$  的高温下具有较高的生长速率，并且其发酵性能也相当良好。对 D-乳酸脱氢酶基因进行敲除后，菌株的生长有可能会受到影响(D-乳酸为细胞壁肽聚糖前体的组分)，因此有必要对敲除菌株的生长状况进行研究，探讨突变株的生长在多大程度上受到了影响。同时，选取另外两株片球菌 *P. acidilactici* DSM20284 和 *P. pentosaceus* ATCC25745 作为对比。

生长曲线实验在 250 mL 的摇瓶中进行，装液量为 50 mL。培养基用简化的 MRS，去掉对生长没有影响的牛肉粉和 Tween 80。42  $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm/min 下培养，每隔 3 h 取样，一直到生长进入稳定期。

#### 3.3.10 高浓度葡萄糖环境中乳酸发酵能力实验

~~本株 *P. acidilactici* DQ2 在真实的纤维素发酵体系中最高能够产生 100 g/L 以上的乳酸，但是其能够耐受的最高葡萄糖浓度却并不是非常的清楚。因此有必要探索该菌株、突变株以及另两种对照菌株能够耐受的最高底物浓度，并且在此高渗环境条件下的产乳酸情况。结合本课题组以前的经验，*P. acidilactici* DQ2 在 75 g/L 的葡萄糖条件下能够生产 68 g/L 的乳酸，得率达到 91.3%。因此，75 g/L 的葡萄糖是不会对菌体的生长以及产乳酸性能产生明显的影响的。以 75 g/L 作为起始浓度，并梯度提高浓度至对乳酸得率产生明显影响为止。~~

#### 3.3.10.1 野生菌株及突变株对抑制物耐受实验

木质纤维素稀酸预处理过程中主要会产生糠醛、羟甲基糠醛(HMF)等抑制物<sup>[9]</sup>，本实验主要研究这两种抑制物对突变株以及野生菌株的影响。为了防止乳酸发酵过程中培养基的酸化，在发酵培养基中添加 0.6 g 碳酸钙/g 葡萄糖来控制 pH 值。乳酸发酵在 50 mL/250 mL 摇瓶中进行，采用简化的 MRS 培养基，在培养基灭好菌以后再添加一定量的抑制物到预先设定的浓度。10%接种量，42  $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm/min 下培养。

由于在添加了碳酸钙后无法测定菌体量，所以抑制物对菌体生长影响实验与乳酸发酵实验分开进行。培养方法与上述大致相同，只是不添加碳酸钙。每 4 h 取样测定  $\text{OD}_{600}$  值，以表征菌体生长情况。

## 3.4 结果

### 3.4.1 敲除载体 pSET4S 的改造

pSET4S 是一种热敏性敲除质粒，最早由日本学者于 2001 年构建<sup>[56]</sup>，主要用于猪链球菌基因组上基因的敲除。相比于常用的自杀质粒，它具有很大的优点。用常规自杀质粒进行基因敲出时，为了保证敲除效率就必须要求有很高的外源质粒的转化效率，而

带格式的：字体：非加粗

带格式的：缩进：首行缩进： 0.85 厘米

带格式的：下标

带格式的：正文

对于革兰氏阳性菌，特别是某些比较难转化的菌来说，提高转化效率是比较困难的<sup>[76]</sup>。而这种热敏性的质粒就能很好的解决这个问题，将敲除质粒转入宿主菌后，在低温下敲除质粒将会大量的复制以保证有足够多的拷贝<sup>[77]</sup>。然后将培养温度升高，质粒的复制将会被关闭从而启动同源重组的发生。另外的一个优点就是，当敲除质粒整合到基因组上后启动质粒的复制，质粒的复制将会大大的提高剪切效率即敲除过程的第二步的效率，从而提高基因敲出的效率。这种热敏性的敲除质粒已经得到经过验证，具有较高的敲除效率。同时，也有一些研究者用此敲除系统成功地的对乳酸菌基因组上的特定基因成功的进行了敲除。如日本学者 Okano K 等<sup>[55]</sup>运用与 pSET4S 类似的敲除系统成功的对 *Lactobacillus plantarum* 的 L-乳酸脱氢酶基因进行了敲除，从而消除了 L-乳酸的生成，达到了生产光学纯度的 D-乳酸的效果。

带格式的：字体：五号

由于 *P. acidilactici* DQ2 对壮观霉素(pSET4S 上抗性标记)具有明显的抗性，并且在并且高达 150 μg/mL 以上，只是后续的筛选工作无法进行致使后续的筛选工作无法进行，所以有必要对抗性标记进行更换。考虑到 *P. acidilactici* DQ2 对红霉素非常的敏感，因此试图将 pMG36e 上的红霉素抗性基因克隆出来，并以其置换 pSET4S 上的壮观霉素抗性基因。通过 PCR 扩增出来的红霉素抗性基因片段大小在 1030 bp 左右(图 3.4(a))，与预期的大小相符。经测序后通过 *Spe* I 单酶切，然后与用相同酶处理过的并经去磷酸化的 pSET4S 连接，转化大肠杆菌

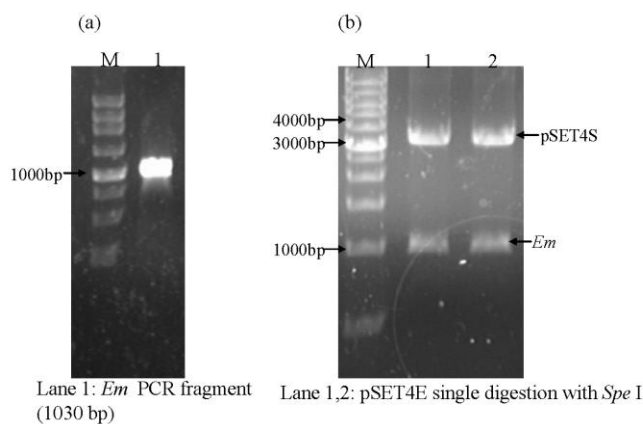


图 3.4 pSET4E 的构建

Fig. 3.4 Construction of pSET4E

XL1-blue，长出菌落后进行菌落 PCR 扩增验证。并提取质粒进行 *Spe* I 单酶切验证(图 3.4(b))，结果显示已经成功的将结果显示已经成功地将 pSET4S 上的壮观霉素抗性基因更换成了红霉素抗性基因。

### 3.4.2 敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD 的构建

选取 D-乳酸脱氢酶基因起始密码子上游的 1 Kb 片段作为上游同源臂，终止密码子下游的 1 Kb 片段作为下游同源臂。先通过 *Hind* III 和 *Bam*H I 两个酶切位点将上游同源

臂片段 UP 连接到 pSET4E 上, 得到 pSET4E-UP。然后通过 *Bam*HI 和 *Eco*R I 两个酶切位点将下游同源臂片段连接到 pSET4E-UP 上得到最终的敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD。PCR 扩增得到的 UP 片段大小在 1 Kb 左右(图 3.5(a)), 与预期的相同。测序、经双酶切后与经过相同酶处理过的 pSET4E 连接, 转化大肠杆菌 XL1-blue, 经过菌落 PCR 验证后抽提质粒进行双酶切验证。双酶切结果如图 3.5(b)所示, 切下来的 UP 片段为 1 Kb 左右, 而 pSET4E 为 4300 bp 左右。

PCR 扩增得到的 DOWN 片段在 1 Kb 左右(图 3.5(a)), 与预期的大小相符。测序、经双酶切过后与用相同酶处理过的 pSET4E-UP 连接转化大肠杆菌 XL1-blue。菌落 PCR 验证结果如图 3.5(c)所示, 扩增出来的片段为 1 Kb 左右。然后抽提质粒, 以引物 UP-S(上游同源臂上游引物)以及 DOWN-A(下游同源臂下游引物)扩增上下游同源臂进行验证, 结果扩增出来的片段大小在 2000 bp 左右(图 3.5(d)), 与预期的大小也相符。至此, 敲除质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD 构建完成。

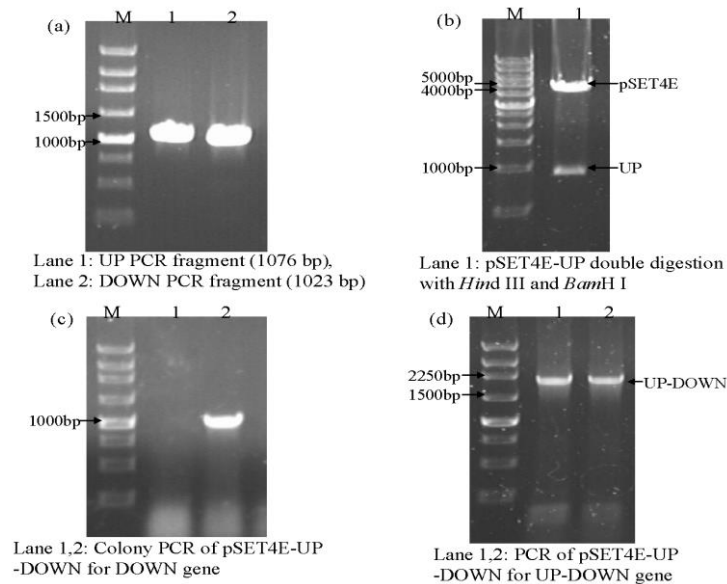


图 3.5 pSET4E- $\Delta$ ldhD 的构建

Fig. 3.5 Construction of pSET4E- $\Delta$ ldhD

提提质粒进行双酶切验证。双酶切结果如图 3.5(b)所示, 切下来的 UP 片段为 1 Kb 左右, 而 pSET4E 为 4300 bp 左右。

PCR 扩增得到的 DOWN 片段在 1 Kb 左右(图 3.5(a)), 与预期的大小相符。测序、经双酶切过后与用相同酶处理过的 pSET4E-UP 连接转化大肠杆菌 XL1 blue。菌落 PCR 验证结果如图 3.5(c)所示, 扩增出来的片段为 1 Kb 左右。然后抽提质粒, 以引物 UP-S(上游同源臂上游引物)以及 DOWN-A(下游同源臂下游引物)扩增上下游同源臂进行验证, 结果扩增出来的片段大小在 2000 bp 左右(图 3.5(d)), 与预期的大小也相符。至此, 敲除

### 质粒 pSET4E- $\Delta$ ldhD 构建完成。

#### 3.4.3 D-乳酸脱氢酶基因敲除单交换菌株的筛选

构建好敲除质粒后从大肠杆菌中抽提足够浓度的 pSET4E- $\Delta$ ldhD，并电转化 *P. acidilactici* DQ2 感受态细胞，获得带有敲除质粒的 *P. acidilactici* DQ2，这样将会获得足够拷贝的同源片段，然后按照上述实验方法中的步骤进行单交换实验。当接种到含有红霉素的 MRS 培养基中并长到稳定期后，稀释一定倍数后涂布红霉素平板，筛选具有红霉素抗性的突变株。因为 pSET4E 为热敏性质粒，在经过高温(>37 °C)培养后，质粒将不会复制，因此筛选得到的菌株绝大多数是发生敲除质粒整合的突变株。

挑选 8 株菌抽提基因组进行验证，首先用引物 RepA-S 和 RepA-A 扩增敲除质粒上的复制子片段，以验证基因组上是否含有质粒片段，结果如下图 3.6(a)所示。从电泳图可以看出，所选取的 8 株菌都可以扩增出目的片段，而以野生 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为对照时没有任何条带，说明这 8 株菌都发生了质粒的整合，但不一定是按照我们预期的方式进行的重组。所以以第二对引物进行验证，上下游引物分别为上游同源臂的上游引物和下游同源臂的下游引物。如果敲除质粒发生了图 3.2 所示的整合，那么以这两个引物扩增出来的条带大小将会在 2 Kb 左右，而不是 3 Kb 的条带。由图 3.6(b)可以看出，前 7 个菌株均不是我们所要筛选的整合菌株，而第 8 株菌是按照预定方式发生重组的突变株。第 9 泳道是以 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为模板进行扩增产物，扩增出来的条带大小应该是 3 Kb。第 10 泳道是以敲除质粒作为模板进行扩增，条带理论大小应该是 2 Kb。所以通过第 9、10 泳道的对照，我们可以得出结论，第 8 株菌确实发生了我们所预期的整合。将本株菌进行甘油保种，并对其进行双交换实验。

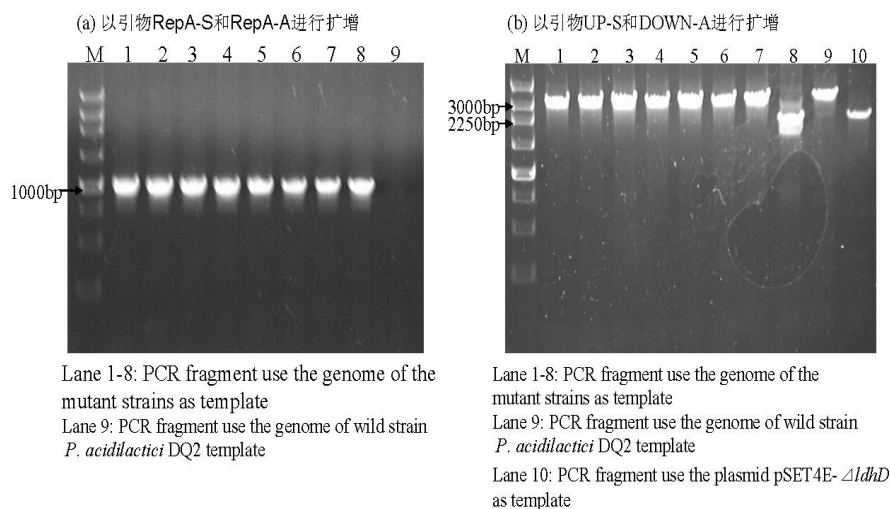


图 3.6 单交换菌株的验证

Fig. 3.6 Verification of the single-crossover recombination strains

*P. acidilactici* DQ2 基因组作为对照时没有任何条带，说明这 8 株菌都发生了质粒的整合。

带格式的：首行缩进： 2 字符

带格式的：字体：宋体

带格式的：居中

但不一定是按照我们预期的方式进行的重组。所以以第二对引物进行验证，上下游引物分别为上游同源臂的上游引物和下游同源臂的下游引物。如果敲除质粒发生了图 3.2 所示的整合的话，以这两个引物扩增出来的条带大小将会在 2 Kb 左右，而不是 3 Kb 的条带。由图 3.6(b)可以看出，前 7 个菌株均不是我们所要筛选的整合菌株，而第 8 株菌是按照预定方式发生重组的突变株。第 9 泳道是以 *P. acidilactici* DQ2 基因组作为模板进行扩增产物，扩增出来的条带大小应该是 3 Kb。第 10 泳道是以敲除质粒作为模板进行扩增，条带理论大小应该是 2 Kb。所以通过第 9、10 泳道的对照，我们可以得出结论，第 8 株菌确实发生了我们所预期的整合。将本株菌进行甘油保种，并对其进行双交换实验。

#### 3.4.4 D-乳酸脱氢酶基因敲除双交换菌株的筛选

单交换即整个敲除质粒整合到宿主基因组上，赋予宿主对红霉素的抗性。接下来还需要诱导整合菌株发生同源重组敲除的第二部反应即双交换，这一步将会发生剪切，将整合质粒从基因组上切除下来，同时也将会发生 D-乳酸脱氢酶基因(*ldhD*)的切除，即可得到 D-乳酸脱氢酶基因的敲除菌株。

将发生单交换的突变株接种到含有 20 mM 的 D,L-乳酸的 MRS 培养基中(无抗生素)，于 28 °C、150 rpm 条件下培养到对数期条件下培养到稳定期，取菌液稀释一定倍数后涂布 20 mM 的 D,L-乳酸的 MRS 平板。同时以 1% 的接种量接种到新鲜的含 D,L-乳酸的 MRS 培养基中继续培养，一共传代 10 次。待涂布的平板上长出单菌落后，用牙签挑取单菌落点种到新鲜的含 D,L-乳酸的 MRS 平板上，同时也点种到含红霉素的平板上，以筛选不具有红霉素抗性的突变株。

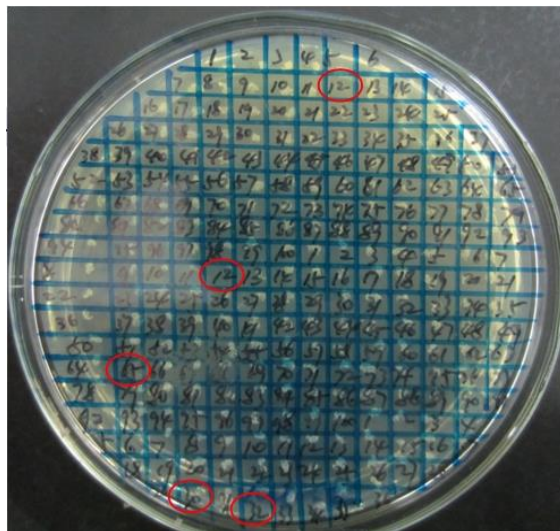


图 3.7 双交换菌株的筛选

Fig. 3.7 Screening of the double-crossover recombination strains

如图 3.7 所示, 从第一代涂布的平板上挑选 236 个单菌落点种到红霉素以及不含抗生素的平板上, 结果发现其中有 5 株菌不具有红霉素抗性, 从相应的不含红霉素的平板上找到此次 5 株菌并划线到新的 MRS 平板上, 待长出后接种到液体 MRS 培养基中培养, 然后抽提基因组进行 PCR 扩增验证。

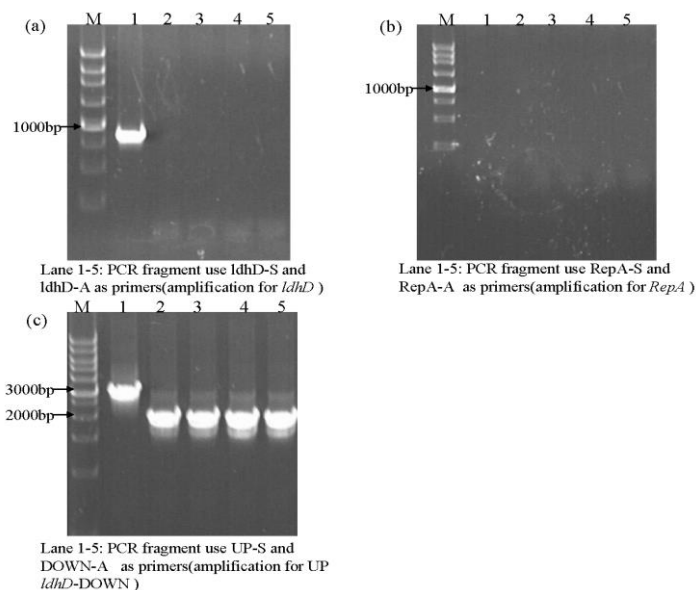


图 3.8 双交换菌株的验证

Fig. 3.8 Verification of the double-crossover recombination strains

图 3.8(a)扩增 D-乳酸脱氢酶基因的核心区域(中间 850 bp)进行验证, 从电泳图可以看出, 所筛选得到的 5 株不具有红霉素抗性的菌株中仅有第一泳道的 12 号菌能够扩增出 *ldhD* 基因, 其他四株在相应位置均没有条带。同时以 5 株菌的基因组为模板, 扩增敲除质粒上的复制子基因片段 *RepA*, 以验证敲除质粒是否成功地从单交换菌株的基因组上剪切下来。从图 3.8(b)可以看出, 5 株菌均不能扩增出相应条带, 说明在第二步的剪切过程中, 敲除质粒都成功地从基因组上剪切下来, 即都发生了第二步的双交换过程。最后以上游同源臂的上游引物(UP-S)和下游同源臂的下游引物(DOWN-A)进行扩增, 看是否能够扩增出预期的 3 Kb 的条带。结果如图 3.8(c)所示, 只有 12 号菌株扩增出来的条带大小在 3 Kb 左右, 而剩下的四株菌 112、165、230 以及 232 号均扩增出 2 Kb 大小的条带。

从以上 PCR 扩增验证的结果可以初步断定, 112、165、230 以及 232 号菌都实现了 D-乳酸脱氢酶基因的敲除, 而 12 号菌在剪切后变成了与原野生菌株相同的类型。

从以上结果可以看出, 此套基因敲除系统有非常高的敲除效率。首先, 在高温关闭质粒复制的情况下, 带有靶基因上下游同源臂的热敏性敲除质粒能够以较高的效率整合到宿主菌的基因组上, 并且整合方式与预期预设的相同, 在挑选的 8 株菌中就有 1 株

发生了预期的整合，效率高达 12.5%。在此基础上进行双交换菌株的筛选，将培养温度调整为 28 °C，在此温度下整合到基因组上的敲除质粒将会发生滚环复制。质粒的复制将会在很大程度上促进剪切的进行，使双交换过程更加的高效。结果也证明在挑选的 236 株菌中就有 5 株菌不具有红霉素抗性，并且后续验证结果也表明这 5 株菌都发生了第二步的双交换过程。因此，同源重组双交换的效率高达  $2.1 \times 10^{-2}$ 。并且在这 5 株发生同源重组双交换的 5 株菌中仅有 1 株剪切后变成了野生型，4 株确实发生了 *ldhD* 的敲除，因此基因敲出效率高达  $1.7 \times 10^{-2}$ 。

### 3.4.5 D-乳酸脱氢酶基因敲除菌株乳酸构型的测定

乳酸菌产生乳酸主要是由乳酸脱氢酶将丙酮酸转化为乳酸，而乳酸脱氢酶分 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶两种类型，分别负责 D-乳酸和 L-乳酸的生成。这两种酶的编码基因序列为 D-乳酸脱氢酶基因(*ldhD*)以及 L-乳酸脱氢酶基因(*ldhL*)，因此对 *ldhD* 的敲除会使 D-乳酸脱氢酶的合成受阻，从而使 D-乳酸的生成被消除。所以对突变株所产乳酸的构型进行测定，以进一步确认 *ldhD* 的敲除。

从以上四菌株中选取两株进行乳酸构型的测定，分别是 112 和 230 号。将菌株培养到对数期后，离心获得培养液上清，进行适当的稀释后用 0.22 μm 的醋酸纤维素膜进行过滤，最后用试剂盒进行 D-乳酸以及 L-乳酸含量的测定。

结果如表 3.7 所示，野生菌 *P. acidilactici* DQ2 所产乳酸中 D-乳酸所占比例为 24.72%，L-乳酸所占比例为 75.28%。而另外两株突变株所产 D-乳酸几乎不能被检测到，L-乳酸所占比例为 99.88%。说明经过对 *ldhD* 的敲除确实阻断了 D-乳酸的生成。但还是有痕量的 D-乳酸生成，这主要与其他酶的作用有关。如羟基异己酸盐脱氢酶(HicDH)，这种酶就具有微弱的将丙酮酸转化为乳酸的能力<sup>[50]</sup>。

表 3.7 突变株乳酸构型的测定

Table 3.7 Configuration detection of the mutant strains

	L-乳酸(g/L)	D-乳酸(g/L)	L-乳酸(%)	D-乳酸(%)
<i>P. acidilactici</i> DQ2	5.30	1.74	75.28	24.72
<i>P. acidilactici</i> Δ <i>ldhD</i> 112	7.34	0.00878	99.88±0.01	0.12±0.01
<i>P. acidilactici</i> Δ <i>ldhD</i> 230	7.20	0.00839	99.88	0.12

带格式的：字体：Times New Roman

带格式表格

带格式表格

### 3.4.6 乳酸脱氢酶活力的测定

对菌株的 D,L-乳酸脱氢酶活力进行测定是一种更为直接的验证基因敲除的方法。通过乳酸脱氢酶将丙酮酸转化为乳酸的逆反应来进行酶活力的测定，在乳酸脱氢酶催化相应底物生成丙酮酸的过程中将 NAD<sup>+</sup>还原成 NADH，而 NADH 可以通过 340 nm 处的吸光度来进行测量。在 BECKMAN DU800 上利用仪器自带的 Kinetics/Time 程序连续监测反应过程中 NADH 的增加，将监测间隔时间设定为 3 S，总测定时间设定为 600 S。得到数据后，将吸光值对时间作图得到一条平滑的曲线，如图 3.9 所示。根据该曲线计

算出反应初速度即 3.2.6 公式(4)中的  $K_{340}$ ，然后通过该公式即可计算出相应的酶活(U/mL)。然后通过 Bradford 法测定所获得粗酶液的蛋白质浓度(mg/mL)，蛋白含量与

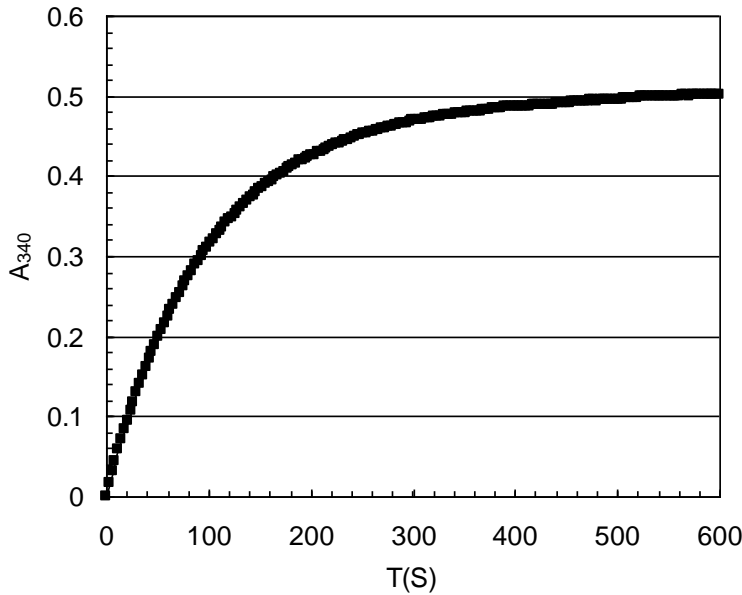


图 3.9 乳酸脱氢酶活测定过程中 NADH 变化曲线

Fig. 3.9 NADH changing curve during the lactic dehydrogenase activity detection

595 nm 吸光度处吸光度标准曲线如图 3.3 所示。通过这两个数据即可计算出基于粗蛋白的乳酸脱氢酶酶活，结果如表 3.8 所示。

表 3.8 突变株乳酸脱氢酶活力测定

Table 3.8 Lactic dehydrogenase activity detection of the mutant strains

	D-LDH(U/mg)	L-LDH(U/mg)
<i>P. acidilactici</i> DQ2	0.2515±0.046	0.194±0.021
<i>P. acidilactici</i> Δ <i>ldhD</i> 112	0.0039±0.0059	0.243±0.047

带格式的: 字体: Times New Roman

带格式表格

带格式表格

从表中可以看出，在野生 *P. acidilactici* DQ2 中，D-LDH 以及 L-LDH 两种酶活力都是存在的，而且大致相当，D-LDH 活力稍高。但是对于 *ldhD* 敲除菌株 *P. acidilactici* Δ*ldhD* 112，我们可以看出 D-LDH 活力几乎不能被检测到，痕量的酶活可能是实验误差。并且在两个平行实验中，有一个样品是完全检测不到 D-LDH 活力的。而 L-LDH 任然存在，并且从表中数据可以看出其活力大致是没有变化的，但是也不能完全肯定，因为实验存在着一定的误差。

通过这组数据我们可以断定，D-乳酸脱氢酶酶活在敲除菌株中是不存在的，也就是说对 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 的敲除成功的阻断了 D-乳酸脱氢酶的表达。

3.4.7 野生菌株以及敲除菌株对万古霉素抗性实验

在 3.3.8 中已经介绍过, 某些乳酸菌对万古霉素具有天然的很高的抗性。万古霉素是一类糖肽类抗生素, 它通过与细胞壁肽聚糖的前体形成复合物从而阻碍细胞壁的合成, 因此会抑制细菌的生长。如果肽聚糖前体的结尾氨基酸-丙氨酸被 D-乳酸所代替的话, 就会降低万古霉素与肽聚糖前体的结合度, 从而使此类细菌对万古霉素具有天然的抗性。

Ferain T 等<sup>[50]</sup>人在对植物乳杆菌 *L. plantarum* NCIMB8826(野生型)进行研究时发现, 该菌对万古霉素的抗性在 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上。并且也对其细胞壁肽聚糖的成分进行了分析, 发现野生菌株大部分的肽聚糖前体最后一位是 D-乳酸而不是丙氨酸。当对该菌株的 D-乳酸脱氢酶基因进行敲除后, 突变株对万古霉素的抗性急剧的下降, 在 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右。对突变株的细胞壁成分进行分析后发现, 以 D-乳酸结尾的肽聚糖的含量大量的减少, 而丙氨酸结尾的肽聚糖的含量大量的升高。

在 3.3.8 中已经介绍过, 某些乳酸菌对万古霉素具有天然的很高的抗性, 因为这些乳酸菌细胞壁前体肽聚糖的最后一位氨基酸丙氨酸被 D-乳酸所替代, 致使万古霉素对细胞壁肽聚糖的结合能力下降, 从而对菌体细胞壁的合成不能够起到抑制作用。本株乳酸菌是在纤维素乙醇生产过程中分离得到的抑制抗性很强的菌株, 并且其产生的乳酸为 D,L-乳酸, 所以极有可能这株 *P. acidilactici* DQ2 对万古霉素也具有抗性, 并且对 *ldhD* 的敲除会使敲除菌株对此种抗生素的抗性下降。

带格式的: 缩进: 首行缩进: 2 字符

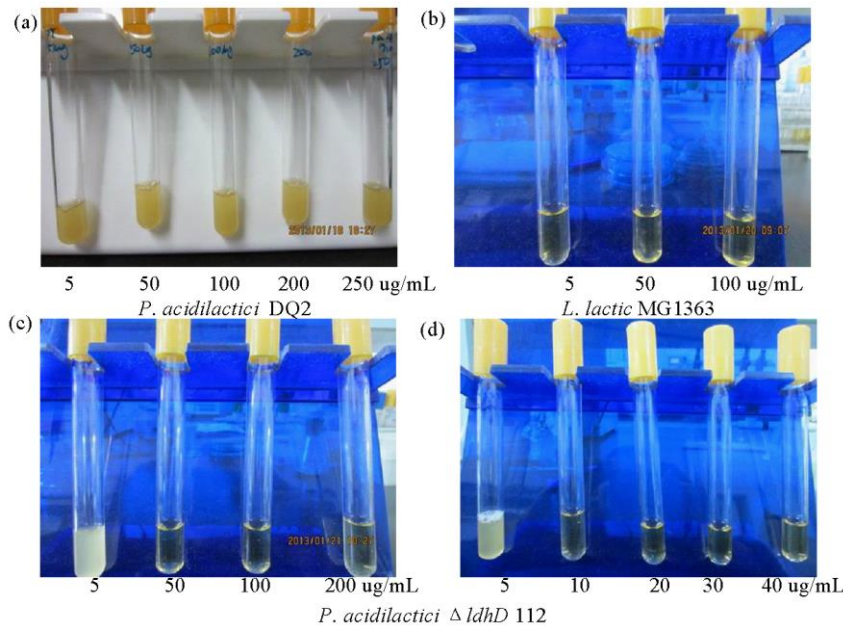


图 3.10 万古霉素抗性实验

(a): *P. acidilactici* DQ2 对万古霉素抗性, (b): *L. Lactic* MG1363 对万古霉素抗性, (c)(d): *P. acidilactici*  $\Delta$ ldhD 112 对万古霉素抗性

带格式的: 字体: 非加粗

带格式的: 字体: 五号

带格式的: 英语(美国)

带格式的: 字体: 倾斜, 英语(美国)

带格式的: 缩进: 首行缩进: 2 字符

带格式的: 英语(美国)

带格式的: 英语(美国)

带格式的: 字体: 五号

Fig. 3.10 Vancomycin resistant of the three strains

(a): *P. acidilactici* DQ2 resistant to vancomycin, (b): *L. Lactic* MG1363 resistant to vancomycin, (c)(d): *P. acidilactici*  $\Delta$ *ldhD* 112 resistant to vancomycin

带格式的: 默认段落字体, 字体:  
(默认) Times New Roman, 五号,  
字体颜色: 自动设置

~~【abcd 没有说明!】~~

从图 3.10 中可以看出, 野生 *P. acidilactici* DQ2 对万古霉素具有非常高的抗性, 在 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上。因此我们可以说 *P. acidilactici* DQ2 的细胞壁肽聚糖前体的最后一位氨基酸丙氨酸也是被 D-乳酸所替代。同时可以看出对照菌乳酸乳球菌 *L. lactis* MG1363 对万古霉素不具有抗性, 说明并不是所有的乳酸菌都具有这一特点。敲除菌株 *P. acidilactici*  $\Delta$ *ldhD* 112 由于不具有 D-LDH, 不能够合成 D-乳酸, 因此对万古霉素的抗性下降到 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右。

综合对敲除菌株基因组 DNA 的 PCR 验证、乳酸构型的测定、乳酸脱氢酶酶活的测定以及最后的对万古霉素抗性实验可以肯定, 我们成功地~~地的~~对 *ldhD* 进行了敲除, 并且此基因的敲除成功~~地的~~阻断了 D-LDH 的表达, 致使 D-乳酸的生成被消除, 使最终所产的 L-乳酸的纯度达到 99.88%, 实现了最初的实验目的。并且我们可以看到, 此基因敲出系统具有非常高的敲除效率, 单交换的效率为  $1.25 \times 10^{-1}$ , 而进行基因敲出的效率为  $1.7 \times 10^{-2}$ 。

#### 3.4.8 *P. acidilactici* $\Delta$ *ldhD* 112 生长状况研究

为了检验 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 的敲除是否会对菌株的生长产生影响, 对突变株以及野生株的生长曲线进行了测定。同时, 为了体现实验室筛选得到的本株 *P. acidilactici* DQ2 的优势, 选取了另外两株片球菌作为对照, 分别为 *P. acidilactici* DSM20284 和 *P. pentosaceus* ATCC25745。结果如下图 3.11 所示。

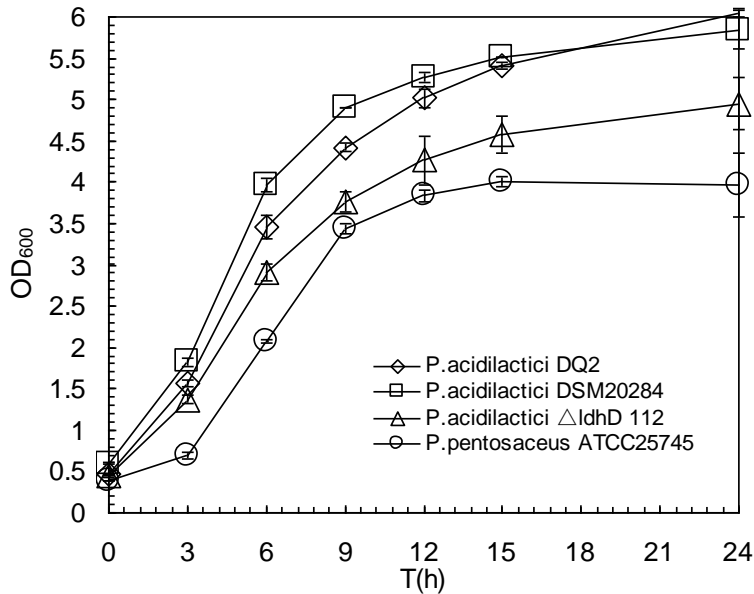


图 3.11 突变菌株生长曲线

Fig. 3.11 Growth curve of the mutant strain

从图 3.11 中可以看出, 相比于野生菌株 *P. acidilactici* DQ2, 敲除菌株 *P. acidilactici*  $\Delta$ ldhD 112 的生长确实受到了一定的影响。生长速率没有野生菌快, 同时以 OD<sub>600</sub> 所表征的最大生物量也有所降低, 从野生型的 6.0 下降到 5.0。进一步说明了 D-乳酸为该菌细胞壁肽聚糖前体的成分, D-乳酸的消除影响了细胞壁的合成从而影响了菌体的生长。其中另外一株乳酸片球菌 *P. acidilactici* DSM20284 生长速率在初期比本株 *P. acidilactici* DQ2 要快, 但是最终的菌体量大致相当。而戊糖片球菌 *P. pentosaceus* ATCC25745 的生长则要慢得多, 即使是与 *P. acidilactici*  $\Delta$ ldhD 112 相比其生长以及最终生物量都要低。

#### 3.4.9 突变株对抑制物耐受性研究

本株 *P. acidilactici* DQ2 对木质纤维素体系具有非常好的适应性, 即对木质纤维素预处理过程中所产生的抑制物具有较高的耐受性。Zhao K 等<sup>[58]</sup>研究了该菌对几种常见的抑制物耐受性, 发现 4.5 g/L 和 3.0 g/L 以内的糠醛和羟甲基糠醛(HMF)对该菌的生长以及乳酸的生产都没有非常明显的影响。为了探讨 D-乳酸脱氢酶基因敲除掉后, 突变株对抑制物的耐受性是否会发生改变。因此, 有必要对突变株进行抑制物耐受实验。同时, 以野生 *P. acidilactici* DQ2 作为对比。

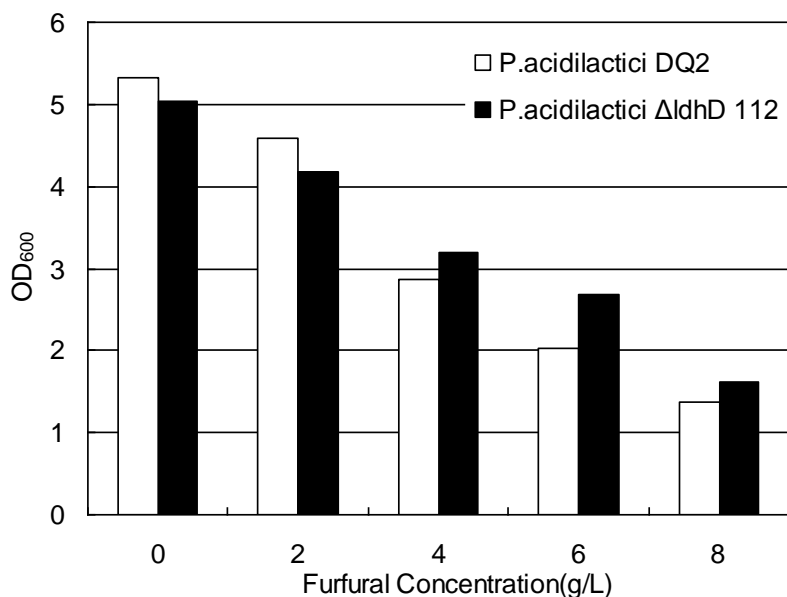


图 3.12 糠醛对野生以及突变菌株生长的影响

Fig. 3.12 Impact of furfural on the growth of wild and mutant strains

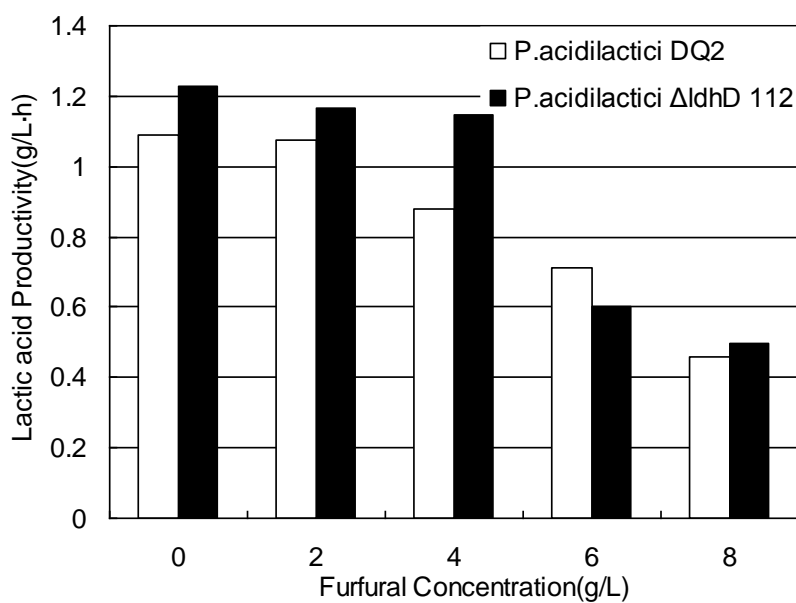


图 3.13 糠醛对野生以及突变菌株乳酸发酵的影响

Fig. 3.13 Impact of furfural on the lactic acid fermentation of wild and mutant strains

带格式的：居中

带格式的：居中

由图 3.12 以及 3.13 可以看出，糠醛对野生菌株和突变株的生长以及乳酸生产的影响趋势几乎是一样的。随着糠醛浓度的不断升高最终的菌体量也在逐渐的降低，在 2 g/L 以内时，糠醛对生长以及乳酸产率的影响都不是很明显。浓度升高到 4 g/L 时，野生菌株的生长以及乳酸产率的下降幅度开始变大。而突变株的生长受影响的幅度也变大，但是乳酸产率变化不是很明显。当浓度达到 6 g/L 时，突变株的乳酸产率开始急剧的下降，从 1.1 g/L h 下降到 0.6g/L h。并且从图 3.12 可以看出，当浓度超过 4 g/L 时突变菌株的菌体量比野生菌株的要高。

带格式的：字体：Times New Roman  
带格式的：两端对齐，缩进：首行缩进： 2 字符

表 3.9 糠醛对野生以及突变株生长以及乳酸产率的影响

Table 3.9 Impact of Furfural on growth and lactic acid yield of the wild and mutant strains

		0 g/L	2 g/L	4 g/L	6 g/L	8 g/L
对菌体生长的抑制率	<i>P. acidilactici</i> DQ2	0	13.92%	46.18%	61.93%	74.01%
	<i>P. acidilactici</i> Δ <i>ldhD</i> 112	0	16.93%	36.44%	46.76%	67.98%
对乳酸产率的抑制率	<i>P. acidilactici</i> DQ2	0	1.01%	19.3%	34.38%	57.81%
	<i>P. acidilactici</i> Δ <i>ldhD</i> 112	0	4.97%	6.28%	50.82%	59.46%

带格式的：字体：非倾斜

带格式的：字体：非倾斜

表 3.9 总结了不同浓度的糠醛对野生和突变株的生长以及乳酸生产的抑制率，可以看出糠醛对突变株生长的抑制率与对野生菌株的相当，甚至是比野生菌株更低。当浓度从 4 g/L 升高到 6 g/L 时，糠醛对突变株乳酸产率的抑制率从 6.28% 急剧升高到 50.82%，而对野生菌株抑制率的变化则相对比较平缓，并且总体上对两种菌的抑制效果也是大体相当的。

图 3.14 和 3.15 总结了羟甲基糠醛(HMF)对野生和突变株生长以及乳酸生产的影响。可以看出随着 HMF 浓度的升高，两种菌的菌体量以及乳酸产率都逐渐的降低，并且变化幅度比较平缓，在浓度达到 7 g/L 时抑制作用最大。综合表 3.10 的结果，可以看出 HMF 对两种菌的抑制作用没有糠醛强，当浓度达到 7 g/L 时对两种菌生长以及乳酸产率的抑制率都在 40% 以内。另外，从生长上来看突变株比野生菌株对 HMF 要更加的敏感，但是差别不大。如对野生菌株生长最大的抑制率为 37.87%，而对突变株最大的抑制率为 49.81%。而 HMF 对两种菌乳酸生产的影响则没有太大的差别，基本上相同。

带格式的：缩进：首行缩进： 0.85 厘米

总结以上两组实验结果我们可以知道，本株乳酸片球菌对糠醛以及羟甲基糠醛具有很高的耐受性。当浓度分别达到 4 g/L 以及 3 g/L 时对生长的抑制作用仅为 46% 和 11%，对乳酸发酵的影响都在 20% 以内，而对于纤维素乙醇发酵微生物来说此剂量几乎是致命的<sup>[78, 79]</sup>。并且对 D-乳酸脱氢酶基因的敲除并没有使该菌对抑制物的耐受性明显的降低。

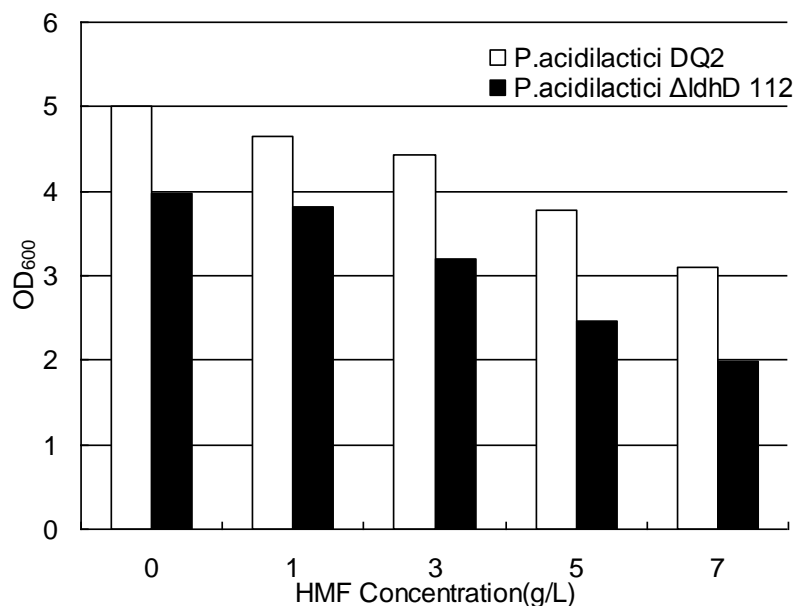


图 3.14 羟甲基糠醛对野生以及突变菌株生长的影响

Fig. 3.14 Impact of HMF on the growth of wild and mutant strains

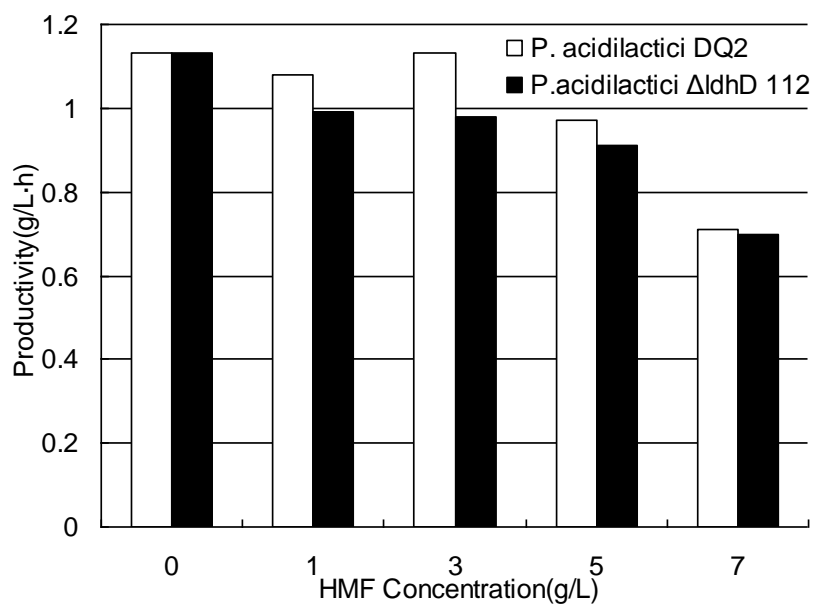


图 3.15 羟甲基糠醛对野生以及突变菌株生长的影响

Fig. 3.15 Impact of HMF on the growth of wild and mutant strains

带格式的：居中

带格式的：两端对齐

表 3.10 羟甲基糠醛对野生以及突变株生长以及乳酸产率的影响

Table 3.10 Impact of HMF on growth and lactic acid yield of the wild and mutant strains

		0 g/L	1 g/L	3 g/L	5 g/L	7 g/L
对菌体生长的抑制率	<i>P. acidilactici</i> DQ2	0	7.07%	11.47%	24.4%	37.87%
	<i>P. acidilactici</i> $\Delta ldhD$ 112	0	3.73%	19.14%	37.76%	49.81%
对乳酸产率的抑制率	<i>P. acidilactici</i> DQ2	0	4.42%	0%	14.16%	37.17%
	<i>P. acidilactici</i> $\Delta ldhD$ 112	0	12.39%	13.27%	19.47%	38.05%

### 3.5 本章小结

(1) 由于本株 *P. acidilactici* DQ2 具有较高的壮观霉素抗性，因此对热敏性敲除载体 pSET4S 进行了改造，将壮观霉素抗性标记更换成红霉素，得到新的敲除质粒 pSET4E，方便了后续的同源重组菌株的筛选。

(2) 通过新质粒构建敲除载体 pSET4E-*AldhD*，并通过预先设定的方案进行第一次同源重组以及第二次同源重组的筛选。通过 PCR 扩增、乳酸脱氢酶酶活测定、乳酸构型测定以及对万古霉素抗性测定等四个方面验证，所筛选得到的突变株 *P. acidilactici*  $\Delta ldhD$  112 确实发生了 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 的敲除。

(3) 在敲除菌株 *P. acidilactici*  $\Delta ldhD$  112 中几乎检测不到 D-乳酸脱氢酶酶活，并且 D-乳酸占乳酸总量的比例从野生型的 24.7% 下降到突变株的 0.12%。之所以还存在微量的酶活以及还有痕量的 D-乳酸生成，可能是因为其他的脱氢酶的在起作用。D-乳酸为本株 *P. acidilactici* DQ2 细胞壁肽聚糖前体的最后一位组成，这一特性赋予其对万古霉素具有非常高的抗性，在 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上。而敲除菌株由于消除了 D-乳酸的生成，所以对万古霉素的抗性下降到了 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以内。

(4) 敲除菌株 *P. acidilactici*  $\Delta ldhD$  112 相比于野生菌其生长速率有所下降，并且生长稳定期的生物量也有所下降。再次说明 D-乳酸对该菌生长确实是必要的，是其细胞壁的组成成分。同时，对 D-乳酸脱氢酶基因的敲除并没有影响到该菌株对木质纤维素体系的适应能力，即敲除后突变株对木质纤维素预处理过程中产生的抑制物仍然具有较强的耐受性，并且相比于野生菌株耐受性并没有发生明显的下降。

## 第 4 章 结论与展望

(1) 通过对乳酸菌常用表达载体 pMG36e 进行改造, 将  $P_{32}$  启动子替换成来源于宿主菌 *P. acidilactici* DQ2 本身的 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 的启动子, 成功的在实验室筛选得到的野生 *P. acidilactici* DQ2 中建立了外源蛋白表达系统。同时, 通过此系统在该菌中成功表达了  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 证明 *P. acidilactici* DQ2 能够表达纤维素酶蛋白, 为构建整合生物过程菌株 CBP 细胞以及其他的基因工程改造奠定了基础。

(2) 但是, 由于 pMG36e 属于低拷贝质粒, 通过此系统所表达的蛋白量偏低。后续的研究可以通过选用高拷贝的载体获得更高的表达量, 或者利用诱导型表达系统来提高表达量, 如乳酸菌中最常用的 nisin 诱导表达系统<sup>[46]</sup>。

(3) 同时, 通过本系统所表达的蛋白主要分布在胞内, 在实际应用中不能够满足 CBP 细胞即直接降解纤维素以及纤维寡糖的要求。因此, 需要将所表达的蛋白分泌到细胞外, 如可以通过将目的基因与信号肽进行融合表达。SPusp45 是乳酸菌中最为常用的前导肽之一, 很多研究者通过目的基因与它的融合表达达到了分泌表达的目的<sup>[45, 80]</sup>。也有研究表明, 蛋白的胞外表达由于可以减少宿主蛋白酶的降解等原因可以获得更高的表达量<sup>[81]</sup>。

(4) 对热敏型敲除质粒 pSET4S 进行改造, 构建得到了适合在 *P. acidilactici* DQ2 中进行基因敲除的敲除质粒 pSET4E。为后续对其他基因的敲除以及将目的基因整合到染色体上进行表达打下了基础。

(5) 运用新的敲除质粒成功的将 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 进行了敲除, 使得敲除菌株所产 D-乳酸的比例从野生型的 24.7% 下降到了 0.12%。扩大了本株乳酸高产菌株所产乳酸的应用范围, 更加接近生产聚乳酸等产品的要求。

(6) 由于 D-乳酸为该菌细胞壁肽聚糖前体的组成成分, 对 D-乳酸的消除影响了菌株的生长。接下来可以通过同样的方法对该菌的 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 进行敲除, 以达到生产光学纯的 D-乳酸的目的。并且 L-乳酸的消除不会影响到菌体的其他生理状态, 能够保留该菌在木质纤维素体系中的优势, 如若改造成功的话将会使其更加具有工业生产的潜力。

## 参考文献

- [1] Joglekar H, Rahman I, Babu S, Kulkarni B, Joshi A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid [J]. Separation and Purification Technology, 2006, 52(1): 1-17
- [2] Doran P, Peterson J, Cook D-M, Brandon S-K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol [J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 582-592
- [3] Wang F, Xiong X-R, Liu C-Z. Biofuels in China: opportunities and challenges [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2009, 45(3): 342-349
- [4] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [J]. Bioresource technology, 2002, 83(1): 1-11
- [5] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review [J]. Bioresource technology, 2010, 101(13): 4851-4861
- [6] Balat M. Gasification of biomass to produce gaseous products [J]. Energy Sources, Part A, 2009, 31(6): 516-526
- [7] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y, Holtzapple M, Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. Bioresource technology, 2005, 96(6): 673-686
- [8] 张建, 楚德强, 于占春, 张小希, 邓红波, 王修胜, 朱智楠, 张怀庆, 戴干策, 鲍杰. 低水用量约束条件下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略 [J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 950-959
- [9] Dong H-W, Bao J. Metabolism: Biofuel via biodetoxification [J]. Nature chemical biology, 2010, 6(5): 316-318
- [10] Mussatto S-I, Roberto I-C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review [J]. Bioresource technology, 2004, 93(1): 1-10
- [11] Zhang J, Zhu Z-N, Wang X-F, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN-1, and the consequent ethanol fermentation [J]. Biotechnology for biofuels, 2010, 3(1): 26
- [12] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production [J]. Biofuels, 2007, 41-65
- [13] Girio F, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte L, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review [J]. Bioresource technology, 2010, 101(13): 4775-4800
- [14] Wee Y-J, Yun J-S, Park D-H, Ryu H-W. Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* [J]. Biotechnology letters, 2004, 26(1): 71-74
- [15] Yun J-S, Wee Y-J, Kim J-N, Ryu H-W. Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp [J]. Biotechnology letters, 2004, 26(20): 1613-1616

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 悬挂缩进: 2 字符, 首行缩进: -2 字符

带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

- [16] Cui F, Li Y, Wan C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis* [J]. *Bioresource technology*, 2011, 102(2): 1831-1836
- [17] Zhu Y, Lee Y, Elander R-T. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 721-738
- [18] Okano K, Zhang Q, Yoshida S, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. d-lactic acid production from cellooligosaccharides and  $\beta$ -glucan using l-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum* [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 85(3): 643-650
- [19] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 中国轻工业出版社, 1999
- [20] Reddy G, Altaf M, Naveena B, Venkateshwar M, Kumar E V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation—A review [J]. *Biotechnology advances*, 2008, 26(1): 22-34
- [21] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(2-4): 87-107
- [22] Wee Y, Kim J, Ryu H. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44(2): 163
- [23] John R-P, Nampoothiri K-M, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2007, 74(3): 524-534
- [24] Teuber M. Lactic acid bacteria [J]. *Biotechnology: Biological Fundamentals*, Volume 1, Second Edition, 2008, 325-366
- [25] Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1983, 49(3): 209-224
- [26] 赵玲艳, 邓放明, 杨抚林. 乳酸菌的生理功能及其在发酵果蔬中的应用 [J]. *中国食品添加剂*, 2004, 5: 77-80
- [27] De Roos N-M, Katan M-B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998 [J]. *The American journal of clinical nutrition*, 2000, 71(2): 405-411
- [28] 李亚玲, 周志江, 韩焯, 王培, 丁成为, 白鹤. 乳酸片球菌抑菌物质细菌素的分离纯化 [J]. *食品科学*, 2008, 29(2): 271-274
- [29] Cleveland J, Montville T-J, Nes I-F, Chikindas M-L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation [J]. *International journal of food microbiology*, 2001, 71(1): 1-20
- [30] Reviriego C, Fernandez A, Horn N, Rodríguez E, Marín M, Fernandez L, Rodríguez J. Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin [J]. *International dairy journal*, 2005, 15(1): 45-49
- [31] Kleerebezemab M, Hols P, Hugenholtz J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(9-10): 840-848
- [32] Xin K-Q. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env [J]. *Blood*, 2003, 102(1): 223-228
- [33] Hirt H, Erlandsen S-L, Dunny G-M. Heterologous *Inducible-inducible Expression*

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 悬挂缩进: 2 字符, 首行缩进: -2 字符

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

- ~~expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 Aggregation-aggregation Substance substance Asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* Contributes contributes to Cell-cell Hydrophobicity-hydrophobicity and Adhesion-adhesion to Fibrin fibrin~~ [J]. Journal of bacteriology, 2000, 182(8): 2299-2306
- [34] Gilbert C, Robinson K, Le Page R-W, Wells J-M. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. [J]. Infection and immunity, 2000, 68(6): 3251-3260
- [35] De Vos W-M. Gene expression systems for lactic acid bacteria [J]. Current opinion in microbiology, 1999, 2(3): 289-295
- [36] Van De Guchte M, Van Der Vossen J, Kok J, Venema G. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. lactis [J]. Applied and environmental microbiology, 1989, 55(1): 224-228
- [37] Chikindas M, Venema K, Ledebouer A, Venema G, Kok J. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts [J]. Letters in applied microbiology, 1995, 21(3): 183-189
- [38] Kim S-J, Jun D-Y, Yang C-H, Kim Y-H. Expression of *Helicobacter pylori* cag12 gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2006, 72(3): 462-470
- [39] Raha A, Chang L, Sipat A, Yusoff K, Haryanti T. Expression of a thermostable xylanase gene from *Bacillus coagulans* ST-6 in *Lactococcus lactis* [J]. Letters in applied microbiology, 2006, 42(3): 210-214
- [40] 孙芝兰, 孔文涛, 孔健. *Paenibacillus* sp. K1 乳糖酶基因 *bga* 在乳酸乳球菌中的表达 [J]. 山东大学学报 (理学版), 2008, 43(7):
- [41] Liang XB, Zhang LX, Zhong J, Huan LD. Secretary expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2007, 75(1): 95-101
- [42] Borrero J, Jiménez J-J, Gútez L, Herranz C, Cintas L-M, Hernández P-E. Use of the *usp45* lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2011, 89(1): 131-143
- [43] Karakas-Sen A, Akyol I. Expression of dar Gene-gene in Lactic Acid Bacteria and Effect effect on Metabolite-metabolite Formation-formation in Fetafeta-Ttype Cheese-cheese Quality-quality [J]. Food Biotechnology, 2012, 26(1): 45-57
- [44] Shareck J, Choi Y, Lee B, Miguez C-B. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology [J]. Critical reviews in biotechnology, 2004, 24(4): 155-208
- [45] Hollmann A, Saviello M, Delfederico L, Saraiva T-D-L, Barh D, Jain N, Tiwari S, Chandra S, Gupta K, Zambare V. Tight controlled expression and secretion of *Lactobacillus brevis* SlpA in *Lactococcus lactis* [J]. Biotechnology letters, 2012, 1-7
- [46] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2005, 68(6): 705-717
- [47] Shigemori S, Yonekura S, Sato T, Nakanishi M, Otani H, Shimosato T. Expression of a Biologically-biologically Active-active GFP- $\alpha$ -S1-Casein Fusion-fusion Protein-protein

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的: 字体: 小四

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

带格式的

...

- in *Lactococcus lactis* [J]. *Current Microbiology*, 2012, 1-7
- [48] Tseng W-C, Fang T-Y, Chang K-C, Pan C-L. Expression of *Synechocystis* sp. PCC6803 *Cyanophycin cyanophycin Synthetase synthetase* in *Lactococcus lactis*. Nisin-Controlled Gene-Expression-Expression System-System (NICE) and *Cyanophycin cyanophycin Production-production* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.009>;
- [49] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 89-93
- [50] Ferain T, Hobbs J-J, Richardson J, Bernard N, Garmyn D, Hols P, Allen N, Delcour J. Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum* [J]. *Journal of bacteriology*, 1996, 178(18): 5431
- [51] Maleret C, Lauret R, Ehrlich S-D, Morel-Deville F, Zagorec M. Disruption of the sole *ldhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-lactate [J]. *Microbiology*, 1998, 144(12): 3327
- [52] Maguin E, Duwat P, Hege T, Ehrlich D, Gruss A. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria [J]. *Journal of bacteriology*, 1992, 174(17): 5633-5638
- [53] Biswas I, Gruss A, Ehrlich S-D, Maguin E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria [J]. *Journal of bacteriology*, 1993, 175(11): 3628-3635
- [54] Gory L, Montel M-C, Zagorec M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products [J]. *FEMS microbiology letters*, 2001, 194(2): 127-133
- [55] Okano K, Zhang Q, Shinkawa S, Yoshida S, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. Efficient production of optically pure d-lactic acid from raw corn starch by using a genetically modified l-lactate dehydrogenase gene-deficient and  $\alpha$ -amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75(2): 462-467
- [56] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis* [J]. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140-148
- [57] Tang YL, Zhang XY, Wu W, Lu ZY, Fang WH. Inactivation of the  $\leftrightarrow$  *sodA*  $\leftrightarrow$  gene of  $\leftrightarrow$  *Streptococcus suis*  $\leftrightarrow$  type 2 encoding superoxide dismutase leads to reduced virulence to mice [J]. *Veterinary microbiology*, 2012,
- [58] Zhao K, Qiao QA, Chu DQ, Gu HQ, Dao T-H, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium  $\leftrightarrow$  *Pediococcus acidilactici*  $\leftrightarrow$  DQ2 [J]. *Bioresource technology*, 2012, DOI:10.1016/j.biortech.2012.09.063
- [59] 楚德强, 赵凯, 吴倩, 陶泰河, 鲍杰. 一株高耐受性乳酸菌的分离及其在木质纤维素发酵生产高浓度 L-乳酸中的应用 [J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2011, 37(5): 521-523
- [60] Gregg D-J, Saddler J-N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1996, 51(4): 375-383
- [61] Garmyn D, Ferain T, Bernard N, Hols P, Delcour J. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase gene [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1995, 61(1): 266-272
- [62] Rodríguez M-C, Alegre M-T, Mesas J-M. Optimization of technical conditions for the

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四, 倾斜

带格式的: 字体: 小四

带格式的: 字体: 小四



thermosensitive replicon from *Lactococcus lactis* as an integration vector for *Enterococcus faecalis* [J]. FEMS microbiology letters, 1998, 161(1): 107-114

[77] Perez-Casal J, Price J-A, Maguin E, Scott J-R. An M protein with a single C repeat prevents phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*: use of a temperature-sensitive shuttle vector to deliver homologous sequences to the chromosome of *S. pyogenes* [J]. Molecular microbiology, 1993, 8(5): 809-819

[78] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification [J]. Bioresource technology. 2000, 74:17-24

[79] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass [J]. Applied microbiology and biotechnology. 2004, 66:10-26

[80] Borrero J, Jiménez J-J, Gúñez L, Herranz C, Cintas L-M, Hernández P-E. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria [J]. Journal of biotechnology, 2011, 156(1): 76-86

[81] Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira S-C, Freitas D-A, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán L G, Nouaille S, Ribeiro L-A, Leclercq S, Gabriel J-E. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production [J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 1-13

[80] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification [J]. Bioresource technology. 2000, 74:17-24

[81] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass [J]. Applied microbiology and biotechnology. 2004, 66:10-26

- 带格式的: 字体: 小四, 倾斜
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四, 倾斜
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四, 倾斜
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四, 倾斜
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 英语(美国)
- 带格式的: 左, 缩进: 左侧: 0 厘米, 悬挂缩进: 2 字符, 首行缩进: -2 字符, 定义网格后不调整右缩进, 行距: 多倍行距 1.25 字行, 不调整西文与中文之间的空格, 不调整中文和数字之间的空格
- 带格式的: 英语(美国)
- 带格式的: 字体: 小四, 字体颜色: 黑色, 检查拼写和语法
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 悬挂缩进: 2 字符, 首行缩进: -2 字符
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: 小四, 倾斜
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 左, 缩进: 左侧: 0 厘米, 悬挂缩进: 2 字符, 首行缩进: -2 字符, 定义网格后不调整右缩进, 行距: 多倍行距 1.25 字行, 不调整西文与中文之间的空格, 不调整中文和数字之间的空格
- 带格式的: 字体: 小四
- 带格式的: 字体: (中文) UtopiaStd-Capt, 小四, 字体颜色: 黑色, 检查拼写和语法
- 带格式的: 德语(德国)
- 带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 悬挂缩进: 2 字符, 首行缩进: -2 字符
- 带格式的: 德语(德国)
- 带格式的: 德语(德国)
- 带格式的: 字体: 小四



## 致谢

感谢我的导师鲍杰教授在学习以及生活中所给予的帮助,本论文是在鲍老师的悉心指导和监督下完成的。鲍老师学识渊博,视野开阔,思维缜密,对本学科的发展有着独到的见解和前瞻性。从本论文的开题到实施再到总结以及论文的写作上处处都得到他的关心和极有价值的意见,每当自己的课题碰到困难时我都能从与他的讨论中得到极大的启发,并从困境中走出。另外,鲍老师治学严谨,对学生严格要求。在这三年的研究生期间,我不仅在学术上取得了收获,在实验操作上打下了坚实的基础。同时也在解决问题的能力以及良好习惯的养成上都有所进步,可以说没有鲍老师的指导就没有我今天在各个方面的进步。在这里我衷心的感谢他,也祝愿鲍老师以及家人幸福安康,在学术上有更大的突破。

感谢高秋强老师、张建老师在实验中以及论文修改中给予的帮助。特别是高老师在论文修改中不厌其烦的给予我帮助,正是在她的精心修改下本论文才得以成稿。张老师在实验中经常的给予关心以及提示,在生活上也给予帮助,祝愿他以及家人天天开心,祝愿他的儿子健康成长。

感谢楚德强师兄以及赵凯师兄给予我的帮助。楚师兄从我进实验室就给予我各方面的帮助,对我对课题的认识以及思路的形成起到了至关重要的作用。每当我在课题或者生活上有不顺心的时候,他都同我沟通以及放松。我衷心的祝愿他事业上能够取得成功,生活上能够事事顺心。

感谢王霞师妹在实验以及生活中给予我的帮助。每当我在实验过程中有急事需要离开时她都给我无私的帮助,帮我进行实验。另外,平时在与她交往的过程中也获取了很多快乐,给我三年的实验室生活增添了不少的乐趣。

感谢我的父母对我的养育之恩以及这些年对我的培养,他们为我付出了太多太多。在今后的生活中我会担起作为一个儿子的责任,好好的报答他们。

感谢罗紫臣、张瑶、易霞、孙娇娥、刘阳、张鹏以及其他的师弟师妹们在实验生活中给予我的帮助,你们陪我度过了令人难忘的研究生生涯。

最后向所有关心我的亲人、朋友、同学致以衷心的感谢。